



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“ANÁLISIS HEMATOLÓGICOS EN EQUINOS INFECTADOS
NATURALMENTE CON EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA
VENEZOLANA EN MINATITLAN, VERACRUZ”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

EDITH ESPINOZA ROSALES

ASESORES:

DR. ALBERTO BARBABOSA PLIEGO

DR. JUAN C. VÁZQUEZ-CHAGOYÁN

REVISORES:

M. EN C. JOSÉ PABLO MEDINA NAVARRO

M. EN C. LEMUEL LEÓN LARA



Toluca México, Junio de 2017.

DEDICATORIA

Dedicado a quienes para la realización de este proyecto entregaron su tiempo y su vida a la investigación que es el único camino para encontrar respuestas.

AGRADECIMIENTOS

Es muy importante para mí agradecer a quienes me apoyaron, ayudaron, otorgaron tiempo y me dieron la oportunidad de realizarme en el camino de la medicina e investigación veterinaria. Principalmente a mi familia que estuvo en las buenas decisiones pero también en las malas, a mis amigos cuyo entusiasmo siempre me animo a ser mejor, al DR. Guillermo Estrada Franco que aunque no pudo estar aquí para ver el resultado final después de tantos años de trabajo, me brindó la oportunidad de iniciarme en la investigación de campo.

Agradezco a mis asesores Dr. Alberto Barbabosa Pliego y Dr. Juan c. Vázquez-Chagoyán y Revisores M. en C. José Pablo Medina Navarro y M. en C. Lemuel León Lara de quienes frecuentemente tome su tiempo retirando de sus labores para resolver dudas o acrecentarlas pero que sin sus muy valiosas observaciones y comentarios este trabajo probablemente no sería el mismo.

Y aunque aquí no mencione sus nombres también es importante decir que uno de los agradecimientos más grande es para quienes en algún momento me subestimaron como mis compañeros y actualmente amigos del Laboratorio Estatal de Salud Pública, compañeros de generación, amigos vecinos y familia, pero es que ningún camino es fácil ni seguro, sin embargo sus comentarios siempre fueron un impulso más. y si en estos agradecimientos me alto a alguien por mencionar una disculpa pero si te conocí o me tope contigo a lo largo de estos años ten por seguro que tuviste que ver para que hoy yo estuviera aquí, Gracias porque este paso solo sirve para continuar..

Índice

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
Resumen	iv
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	4
III. Justificación.....	30
IV. Hipótesis	31
V. Objetivos.....	32
VI. Material y métodos	33
VII. Límite de espacio y tiempo	39
I. Resultados.....	41
II. Discusión	50
III. Conclusiones.....	58
IV. Sugerencias	59
V. Literatura citada	60

Resumen

Una gran cantidad de las enfermedades virales pasa desapercibida hasta que estas se desatan como epidemias, ejemplo de ello, son las causadas del genero *Alphavirus*, entre los que destaca el complejo de la EEV (Encefalitis Equina Venezolana), la cual frecuentemente produce alteraciones en los organismo afectados sin presentar un patrón claro que nos ayude a formular un diagnóstico, propagándose la enfermedad y afectando a la población (Góngora, 2003; Pérez y col., 2004). Existen varias formas de determinar la infección por EEV, siendo a más eficiente la detección viral sin embargo se podría técnicas diagnósticas auxiliares, como la biometría hemática que para detectar los principios de viremia e infección causados por este patógeno (Dávila y col., 2012; Almager, 2013). Por lo tanto usando este enfoque, se realizaron estudios intensivos sobre la enfermedad, ubicándonos en una región al Sur del estado de Veracruz. El área de estudio comprende la Cuenca de Río Coatzacoalcos y específicamente la periferia y zonas agrícolas de la Ciudad de Minatitlán, Veracruz. Para el estudio experimental se utilizaron 7 yeguas negativas a EEV que se expusieron 21 días consecutivos en al área sospechosa de circulación viral se utilizó la biometría hemática y temperatura como indicadores de infección, los cambios fueron evidentes a partir de las 12 horas de exposición, las principales fluctuaciones se observaron los días 3 y 4 exposición. Los cambios observados fueron en la línea celular roja y blanca, como anemia y leucocitosis severa, coincidiendo con las elevaciones de temperatura. La confirmación de nuestros casos sospechosos por biometría hemática se logró con un estudio extraordinario de aislamiento viral.

I. Introducción

La EEV es una infección viral que se transmite a humanos y caballos mediante la picadura de mosquitos generando enfermedad grave incluso mortal. El virus de la EEV pertenece al género *Alphavirus* de la familia *Togaviridae* y posee diferentes variantes antigénicas. El reconocimiento de estas variantes es de gran importancia epidemiológica ya que nos permite reconocer el grado de virulencia para los equinos y la causa de las epidemias (Acha y Szyfres, 1986; Aguilar y col., 2011).

Este virus es originario de las Américas y no se ha comprobado su existencia fuera de este continente. Las epidemias se han presentado desde Texas, Estados Unidos, hasta el Sur de Ica, Perú. Se conocen varios focos naturales en América, incluido Veracruz, México (Álvarez y col., 1999; IICA, 2008).

Desde el aislamiento del virus de la EEV en 1938, ha habido muchos brotes y epidemias en el continente Americano estas suelen ser de carácter explosivo. Por otra parte la vigilancia epidemiológica de la EEV ha disminuido en América Latina y pocos países han informado sobre casos esporádicos o brotes de encefalitis en equinos, sin embargo, un documento de la Organización Panamericana de la Salud (1993) que resume la información disponible entre los años 1989-1993, señala que tanto América central como en Colombia, México y Venezuela se presentaron brotes de enfermedad neurológica en equinos compatible con las encefalitis equina (Brito y col, 2003; Morilla y Mucha, 1969; Adams y col., 2012).

Los focos naturales de infección se encuentran en selvas húmedas y regiones casi siempre pantanosas de América. Hay variaciones estacionales en la actividad del virus que es más pronunciada en la estación lluviosa. Sin embargo, la actividad es continua. En las zonas afectadas, la mortalidad de los equinos alcanza entre 20 y

40%. La tasa de letalidad entre los equinos con signos encefálicos es muy alta y puede llegar a 80% de los casos. (Estrada, 2004; Adams y col., 2012).

El ciclo del virus se mantiene entre los équidos y varias especies de mosquitos. El papel de los équidos como amplificadores del virus epizootico es esencial para el mantenimiento continuo de la infección (Estrada, 2004).

Cuando la enfermedad en los equinos es clínicamente observable, los signos son similares a los de la Encefalitis Equina del Oeste y Encefalitis Equina del Este. En algunos de los animales afectados la infección se manifiesta por una enfermedad febril benigna, estos signos se acompañan con ligera leucopenia y viremia baja o nula, los animales se recuperan sin secuelas, por lo tanto, se vuelve un poco difícil de diagnosticar y el padecimiento suele pasar desapercibido (Acha y Szyfres, 1986; Adams, y col., 2012). Aunque existen varias formas de determinar la infección por EEV; el diagnóstico definitivo solo se logra con la detección viral y la detección de anticuerpos IgM o IgG. Sin embargo, estos métodos tienen ciertas limitaciones.

Debido a que la detección viral se puede realizar únicamente durante el periodo de viremia, entre los días 7 y 12 post infección. Sin embargo, dados ciertos factores, tanto externos como del individuo tienen gran influencia y se hace difícil determinar con exactitud el periodo de viremia y realizar la toma de muestras para el aislamiento viral. Una forma en que se podría reducir el tiempo de espera y hacer un diagnóstico presuntivo temprano, sería realizar una evaluación diaria de los parámetros sanguíneos para identificar los cambios que ocurren durante la infección temprana cuando el sistema inmune innato intenta controlar la infección. Por lo tanto con la biometría hemática como técnica auxiliar puede determinar con mayor exactitud el momento en que el individuo este padeciendo la viremia.

Tomando en cuenta lo anterior el estudio realizado tuvo como objetivo principal detectar los cambios hematológicos mediante biometría hemática en equinos expuestos a la infección natural con el virus de la EEV en Veracruz, Minatitlán, proporcionando datos que faciliten el reconocimiento y diferenciación del padecimiento en los equinos respecto a otras enfermedades con características similares.

II. Revisión de literatura

Antecedentes de la Encefalitis Equina Venezolana

Algunas de las Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETV) como la Encefalitis Equina constituyen un grupo de enfermedades causadas por Arbovirus de la familia *Togaviridae*. Las de mayor importancia por su distribución y los daños que producen en las Américas son las Encefalitis Equina del Este, Encefalitis Equina del Oeste y la Encefalitis Equina Venezolana, pues ocasionan un impacto negativo, económico y social en la población afectada (Álvarez y col., 1999; Adams y col., 2012).

La Encefalitis Equina Venezolana es la forma más grave, considerada una enfermedad infecciosa emergente en Latino América. Ocasiona una alta morbilidad y mortalidad en los equinos, la cual sumamente importante para el hombre por la velocidad que las epidemias pueden alcanzar, además la enfermedad pueden atravesar barreras naturales y extenderse a casi todo el continente (ejemplo; la epidemia ocurrida desde Texas, Estados Unidos hasta el Sur de Ica Perú). En la América tropical y subtropical se conocen varios focos naturales donde las variantes antigénicas circulan entre vertebrados inferiores y mosquitos. México posee un foco ubicado en el estado de Veracruz, y es posible que existan otros focos naturales aun no reconocidos en diferentes regiones tropicales y subtropicales de América (Estrada, 2004; García y col., 2002; Adams y col., 2012).

Las primeras descripciones de la enfermedad clínica en équidos se realizaron en 1935, J.E. Albornoz, en la Universidad Nacional de Colombia, durante una epizootia iniciada el año anterior, sin embargo en América del Sur en la década de 1920 existieron casos de enfermedad en equinos referidas como "peste loca" (Morilla y Mucha, 1969).

Durante 1936 y 1937 se presentó una epidemia de EEV en Venezuela, causada por la variante IAB. Desde el aislamiento del virus de la EEV en 1938 por Kubes y Ríos; se han notificado casos y brotes en 12 países de las Américas. Estas epidemias son de carácter explosivo, es decir, poseen una tasa de ataque alta que puede superar al 10% de la población humana afectada (Álvarez y col., 1999; Brito y col., 2008).

Aunque la enfermedad en humanos se conocía desde 1943, debido a un accidente de laboratorio fue hasta 1944 que fue considerada como posible enfermedad natural. Lográndose aislar el virus hasta 1950 de una paciente febril, durante un brote de enfermedad en humanos, en Colombia. No se notificaron equinos enfermos indicando la presencia de una cepa con características epidémicas, las complicaciones fueron de tipo neurológicas ocasionales y mortalidad en seres humanos (Aguilar y col, 2011; Brito y col., 2008).

De 1935 a 1961 los brotes se limitaron a Colombia, Venezuela, Perú y Trinidad y Tobago realizándose aislamientos repetidos en humanos con infección natural (Acha y Szyfres, 1986; IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 2008).

La enfermedad se consideró propia del norte de Sud América y Panamá hasta la epidemia ocurrida entre 1962 y 1972 cuando aparecieron brotes de EEV todos los años y se extendieron a América Central, México y Estados Unidos. (Morilla y Mucha, 1969).

La mayor epidemia conocida ocurrió en 1969 causada por el subtipo IAB que se difundió de Ecuador a Guatemala, extendiéndose a otros países latinoamericanos incluido México, hasta llegar a Texas, Estados Unidos en 1971. En solo dos años la epidemia cubrió una distancia de 4,000 km (Acha y Szyfres, 1986; Mesa y col., 2005; Brito y col., 2008). En Colombia los servicios de salud notificaron 200.000

casos humanos y en Ecuador cerca de 31.000, 310 defunciones humanas y alrededor de 20.000 caballos muertos; en México se presentaron 16.805 casos humanos, con 42 muertes. Algunos expertos creen que esta epidemia se debió al empleo de una vacuna inactivada con formol y portadora de virus vivos (Adams y col., 2012; Diana, 2009).

De 1972 a 1977 solo se presentaron algunos brotes de la EEV en equinos en Guayana, Perú y en la península de La Guajira en Venezuela. Esto provocó que la vigilancia epidemiológica disminuyera en América Latina y pocos países han informado sobre casos o brotes de encefalitis en equinos. Sin embargo un documento de la Organización Panamericana de la Salud (1993) resume información de los años 1989-1993 en América Central como en Colombia, México y Venezuela hubo brotes de enfermedad neurológica en equinos compatible con las encefalitis equinas. Los daños que ocasiona la EEV son variados a los seres humanos los puede incapacitar temporalmente o causarles la muerte, en las zonas afectadas generalmente las rurales donde los equinos son el principal medio de transporte la mortalidad alcanza entre el 2 y 40%, la proporción de equinos enfermos que mueren varía entre 38 y 83% (Acha y Szyfres, 1986, Álvarez y col., 1999; Morilla y Mucha, 2010).

Esta situación amerita decisiones e inversiones, con la participación de los sectores salud y agricultura (Diana, 2009; IICA, 2008). Por lo tanto es imprescindible mejorar los medios de diagnóstico y reforzar a vigilancia epidemiológica a través de estudios sencillos pero prácticos que orienten el diagnóstico.

Situación en México

En la región sureste de México (Costa de Chiapas, sur de Veracruz, Istmo de Oaxaca, Costa de Oaxaca, centro de Chiapas y Cuenca del Papalopapan) zonas de clima cálidos húmedos y sub húmedos con lluvias en verano del 5 – 10 % anual se reportan con regularidad casos de neuropatías en équidos además se demostró por evidencias clínico-epidemiológicas, serológicas e histopatológicas, la circulación del virus de la EEV subtipo IE (Estrada, 2004; Adams y col., 2012).

Frente a la característica equicida que adquirió la variante IE se propuso que, estos brotes se pudieron producir, por el ingreso de équidos susceptibles, a áreas de constante circulación viral, sin una protección inmune adecuada; el virus constituye en la actualidad un problema importante para la zona sur del país donde constantemente se transportan y circulan animales de distinto origen (Adams y col., 2012; Diana, 2009).

Epidemia

La presentación de epidemias constituye una situación esporádica para algunos países y cíclica para otros. En cualquiera de los casos constituyen un riesgo para los países de las Américas, en este sentido se han identificado algunos factores fundamentales para la aparición de las mismas. El riesgo de exposición a las enfermedades transmitidas por vectores, tiene que ver con factores relacionados con: crecimiento poblacional de individuos susceptibles (équidos), reservorios, población vectorial, cambios climatológicos (períodos de lluvias), ampliación de la frontera agrícola, migraciones y viajes aéreos (Acha y Syfres, 1986; Mesa y col., 2005).

Para que se presente una epidemia de EEV después de largos períodos de tiempo entre brotes, se necesita reunir varios factores como son: adecuado número y cercanía de reservorios animales; focos naturales con infección persistente en roedores, aves silvestres y quirópteros; huéspedes intermedios infectados; presencia de aguas estancadas que favorecen la aparición de criaderos de insectos vectores y una mayor exposición de animales domésticos y personas susceptibles; baja cobertura de vacunación. Otros factores que pueden influir son el índice pluviométrico elevado, las migraciones internas (desplazamientos humanos y su congregación en áreas vulnerables), el hacinamiento en los campos de refugiados y las pobres condiciones higiénicas (Adams y col., 2012).

Caracterización de Áreas de Alto Riesgo

Para realizar una adecuada caracterización del riesgo, se deben tener en cuenta los siguientes aspectos: indagar por la ocurrencia de muertes de équidos, identificar animales enfermos o con comportamiento inusual; detectar la presencia de animales febriles, en contacto con animales enfermos; tomar muestras pareadas de sangre en équidos, para búsqueda de anticuerpos y toma de muestras de tejido cerebral de los animales muertos para aislamiento viral; determinar la circulación de los équidos y la exposición de grupos poblacionales relacionados; evaluar las coberturas de vacunación; estimar las tasas de reproducción y la magnitud de la población susceptible (Adams y col., 2012; IICA, 2008; SENASA, 2012).

En áreas de alto riesgo se realizan estudios de vectores, de reservorios, identificando las especies animales que puedan estar infectadas con el virus, estimando su población relativa y el potencial de reproducción, realizando el

seguimiento de la actividad viral mediante el empleo de animales centinela (Estrada, 2004).

También se puede realizar la búsqueda y la caracterización de criaderos en el área problema y la captura y remisión de larvas para su identificación, el monitoreo de especies, la densidad, la estructura etaria y la tasa de infección viral en mosquitos adultos (SENASA, 2012; IICA, 2010).

Agente etiológico

El agente etiológico de las Encefalitis Equinas es un virus RNA, de la familia *Togaviridae*, género *Alphavirus*, originario de las Américas y limitado a este hemisferio (Mesa y col., 2005).

El complejo taxonómico del virus de la EEV, se ha clasificado en diferentes subtipos con sus respectivas variantes, según sus características antigénicas, con reacciones serológicas similares, pero con un comportamiento biológico y distribución geográfica diferente, con relación a los huéspedes susceptibles y a las características patogénicas (Adams et al., 2012). Este virus comprende varias especies que forman el complejo de las EEV, al menos se han descrito 14 subtipos y variedades dentro del complejo EEV. Sólo variedades subtipo IAB y C se han asociado con las principales epidemias (Aguilar *et al*, 2011; Quin y col, 2008; MacLachlon and Duboui, 2011). El subtipo 1 es muy virulenta para el caballo y causa epidemias. Las variantes ID, IE y IF y los subtipos II (variante similar a ID), III, IV, V y VI, se han asociado con actividad epidémica (Smith y col., 2011).

Morfología del virus de la EEV.

El virus posee una cápside de forma icosaédrica rodeada por una membrana, con apariencia difusa y proyecciones finas (Knipe y Howley, 2001; Smith, y col., 2011). El tamaño de los viriones es de 65 a 70 nanómetros, estructuralmente el virus está formado por un genoma de ácido ribonucleico de cadena sencilla, de 40 a 80 nm de diámetro, se destruye con el calor y con el éter y crece en cultivos celulares de diversos vertebrados (Knipe y Howley, 2001). La replicación del RNA monocatenario de sentido positivo tiene lugar en el citoplasma y sus nucleocapsides se ensamblan en el citosol (MacLachlon y Duboui, 2011; Quinn y col., 2008).

Por lo tanto en los vertebrados la infección por los *Alphavirus* provoca destrucción de las células cerebrales, mientras que en los no vertebrados la infección es persistente pero no citolítica en ellos la envuelta del virus se adquiere cuando la nucleocápside sale por gemación a través de la membrana plasmática que contiene espículas glucoproteicas de origen viral. En esta situación el ensamble del virus se produce en asociación con las membranas intracelulares (MacLachlon y Duboui, 2011; Quinn y col., 2008). Cuando los equinos o humanos son infectados con el virus de la EEV presentan títulos altos de viremia pueden ser suficientes para que un solo animal infecte a varios miles de mosquitos en un día. Por eso se le atribuye a los équidos el papel de amplificadores virales y son esenciales en la propagación de epidemias y es por esa razón que se les suele considerar hospedadores finales (MacLachlon y Duboui, 2011; Adams y col., 2012).

Los animales de laboratorio utilizados (rata, ratón, cuyo, hámster y conejo) se han manifestado en los contagios experimentales, como especialmente receptivos al virus de la EEV (Estrada, 2004; Morilla y Mucha, 1969).

Además los viriones poseen 3 polipéptidos uno con un alto contenido de lisina asociado con el ARN y dos glucoproteínas, y que junto con los lípidos estructurales forman la membrana viral (Morilla y Mucha, 1969).

Los viriones maduros de los Alphavirus son sensibles a los cambios de Ph, al calor, a los detergentes y desinfectantes y no son estables en el ambiente (Knipe y Howley, 2001; Quinn y col., 2008).

Ciclo biológico

La EEV, se presenta en la naturaleza en focos a un bajo nivel, conservando una actividad continua, logrando así, permanecer por períodos de tiempo indefinidos en condiciones ecológicas bien definidos como en las selvas húmedas tropicales, territorios pantanosos y bosques lluviosos y en las regiones pantanosas de América tropical y subtropical. Tienen ciclos de amplificación viral que involucran vertebrados silvestres (roedores principalmente) y mosquitos. Bajo estas condiciones el hombre y los équidos pueden involucrarse casualmente en este ciclo, cuando ingresan al ecosistema, afectándose cuando sus poblaciones son susceptibles y funcionan como reservorios. Por lo general, estos virus no comparten el mismo rango geográfico, haciendo que su estudio y la elección de las medidas de prevención y control, requieran del conocimiento de múltiples áreas y del trabajo interdisciplinario (Mesa y col, 2005; Brito y col., 2008; IICA, 2008; Adams y col., 2012).

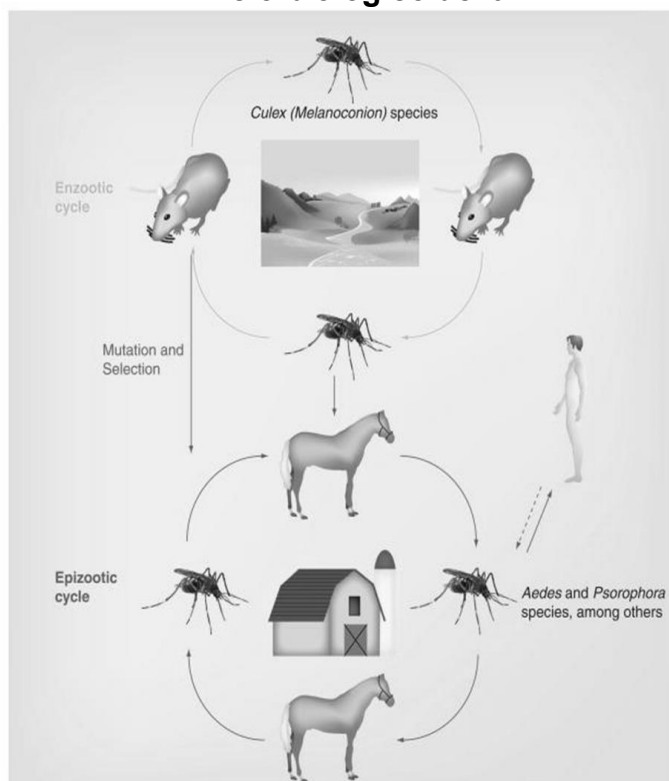
Las variantes silvestres IE, ID, Everglades, Mucambo y Tonate de EEV generalmente no son patógenas para el humano, y esporádicamente causan epidemias con algunas muertes, por lo general son solo pequeños brotes de una enfermedad aguda, febril y benigna en la población susceptible que suelen ocurrir al final de la época de lluvias en las regiones tropicales y subtropicales de América, lugares típicos para la agricultura. En los équidos estas variantes son generalmente no patógenas, a excepción de la variante IE, que ha provocado casos en Centroamérica y México (Mesa y col, 2005; Aguilar y col, 2011; Adams, y col., 2012).

La infección con las cepas silvestres en humanos y équidos produce fiebre, títulos moderados de anticuerpos y una viremia de bajo nivel, por lo cual no se asocian como huéspedes de mantenimiento viral. Son de mayor importancia los equinos que suelen desarrollar una viremia lo suficientemente elevada como para infectar

a miles de mosquitos hematófagos en un día, además de poder eliminar en los líquidos corporales los virus que podrían propagarse por el contacto directo o a través de aerosoles. Estos títulos persisten en el equino por 4 o 5 días. Por eso se atribuye a los equinos el papel de amplificadores virales, debido a que incrementan el riesgo de infección y la propagación de la epidemia (Estrada, 2004; Mesa y col., 2005).

Al depender de los équidos como huéspedes primarios en este ciclo, la circulación del virus posteriormente se lleva a cabo por medio de mosquitos, quienes transmiten la infección de un equino virémico a otro susceptible, al hombre y a otros vertebrados. Estudios epidemiológicos señalan que las epidemias terminan cuando se agotan los equinos susceptibles por infección natural o la inmunización (Estrada, 2004; Aguilar y col., 2011; Smith y col., 2011).

Ciclo biológico de la



Fuente. Aguilar P, **Estrada JG**, Weaver SC, Haddow A. (2011).

El hombre se puede infectar por acción de vectores eficientes, o por la inhalación del virus en el laboratorio. Las infecciones en humanos, que aparecen paralelamente a las de los équidos, comienzan una a dos semanas después de los casos équidos. (Mesa y col., 2005; Anishchenko y col., 2005; Adams y col., 2012).

Vectores

Varias especies de insectos hematófagos son susceptibles o actúan como vectores eficientes del virus de la Encefalitis Equina Venezolana. Como los artrópodos del género *Aedes*, *Anhoples*, *Culex*, *Mansonia*, *Psophora* y posiblemente *Ochlerotatus*. Las moscas negras y los ácaros pueden ser vectores mecánicos importantes para cepas epizoóticas para algunos brotes (Estrada, 2004; Adams y col., 2012).

La infección en los artrópodos vectores, depende de la viremia del vertebrado, el establecimiento de la infección en el intestino del mosquito y la temperatura ambiente (Anishchenko y col., 2005; Brito, y col., 2008). Los mosquitos adquieren el virus al alimentarse de reservorios y huéspedes infectados, el agente se establece en el intestino de dichos vectores y se replica, posteriormente puede transmitir la enfermedad a vertebrados susceptibles (Mesa y col., 2005; IICA, 2008).

La abundancia y la variedad de los vectores en el ecosistema, garantizan el mantenimiento y la transmisión del complejo de EEV. La densidad de mosquitos varía durante el año, las mayores capturas se han logrado en el mes de mayo seguido de julio, período durante el cual se inicia la temporada de lluvias (Estrada, 2004; Mesa y col 2005).

Con un período de incubación mayor a los 7 días ya se observa la capacidad vectora y transmisora del mosquito. Cuando éste es de 7 a 9 días, el 14% de los mosquitos lo transmite, mientras que si el periodo es de 11 a 12 días el porcentaje de transmisores positivos sube al 67%. Bajo esta situación, hay una concentración suficiente del virus en las glándulas salivales, para garantizar la transmisión por picadura (Mesa y col, 2005; Adams y col., 2012).

Los mosquitos prefieren las lagunas o pantanos de aguas salobres en áreas costeras, su desarrollo es dependiente de las lluvias y las mareas altas actúan como factor regulador. Tiene una vida media de 3 semanas, las hembras adultas son muy voraces y pican a un mamífero cada tres días, presentan actividad diurna y nocturna. Con la ayuda de los vientos puede recorrer hasta 50 kilómetros (Brito, y col., 2008; Anishchenko y col., 2005; SENASA, 2012).

Reservorios y Huéspedes

Los arbovirus persisten en la naturaleza durante el invierno o estación de no vectores, por la infección asintomática de animales silvestres (huéspedes selváticos) como aves, pequeños mamíferos, roedores, reptiles (Acha y Syfres, 1986).

Las especies de roedores silvestres que actúan como reservorios principales de EEV en los ciclos enzoóticos son: *Sigmodon* (rata de algodón), *Proechimys* (ratón conato o rata espinosa), *Peromyscus* (ratón de campo), *Oryzomys* (rata arroceras), *Zigodontomys* y *Heteromys* (Dickerman y col., 1964; Estrada, 2004; Adams y col., 2012).

Otros reservorios reconocidos pueden ser los murciélagos y también los marsupiales principalmente la zarigüeya (*Didelphis marsupialis*) (Aguilar et al, 2011).

En el ciclo los vertebrados que participan presentan una infección asintomática. Los roedores parecen infectarse a edad temprana y mantienen el virus de por vida, lo que los hace unos reservorios ideales (Dickerman y col., 1964).

En zonas endémicas de EEV, las especies domésticas como caninos, porcinos, ovinos, caprinos, bovinos, aves y aún reptiles y quirópteros se pueden infectar, presentando títulos de anticuerpos específicos sin sufrir la enfermedad; estos animales son importantes en la epidemiología de la EEV, pues desvían los mosquitos hacia ellos, disminuyendo la agresión para otros huéspedes (Estrada, 2004; Mesa y col, 2005).

Por lo anterior, podrían servir como animales centinela para identificar las diferentes cepas virales y como apoyo diagnóstico (Pérez y col., 2004; IICA, 2008).

Aspectos Ecológicos

La presencia de las arbovirosis está limitada por las condiciones geográficas o climáticas, que determinan la distribución de los vectores, huéspedes, reservorios y los agentes causales. En Colombia al igual que en otros países americanos, se emplea como método de caracterización básico el “sistema de clasificación de formaciones vegetales”, el cual permite localizar las diferentes regiones que son favorables para el desarrollo del virus. Las epidemias ocurren en zonas que por sus características favorecen la permanencia de una población de mosquitos

vectores como las que se describen en el cuadro 1 (Rivas y col., 2003; Aguilar y col., 2011).

La temperatura ambiental desempeña un papel importante en la replicación del virus en los vectores, la temperatura propicia para la replicación debe ser mayor a 24 °C. Además todas las especies de mosquitos necesitan del agua para el desarrollo de su ciclo evolutivo, razón por la cual los períodos de lluvias o las áreas con aguas estancadas o de poca corriente favorecen el aumento de las poblaciones (Mesa y col., 2005; SENASA, 2012).

Cuadro 1. Características ecológicas para Cepas Epidémicas	
Característica	Especificación
Altitud	0 a 1.100 - 1.200 m.s.n.m.
Temperatura	Promedio anual mayor a 24°C.
Lluvias estacionales	500 - 2.000 mm / año.
Zonas	Holdridge (áreas desérticas o semidesérticas, matorrales desérticos, bosque tropical seco, muy seco y monte espinoso tropical).
Vectores	Presencia de vectores epizoóticos
Reservorios	Presentes en áreas vecinas
Hospedadores	Animales domésticos susceptibles principalmente el equino

Fuente: SENASA, 2012

Las epidemias de EEV ocurren cuando las variaciones climáticas son fuertes, acompañadas de aumentos en la temperatura media anual y en épocas de lluvias (precipitaciones pluviales moderadas pero estacionales) en las regiones áridas o semiáridas tropicales y subtropicales de América, lo cual favorece la formación

pasajera de criaderos de mosquitos vectores (Estrada, 2004; Mesa y col, 2005; Adams, et al., 2012).

Presentación clínica en equinos

Los signos clínicos de la EEV en animales se pueden confundir con la de otras enfermedades virales. En équidos la sinología por la enfermedad de EEV es similar durante las diferentes etapas de desarrollo. Durante la etapa de viremia es muy extraño encontrar animales con signos clínicos marcados pero si es posible encontrar en sangre leucopenia con reducción de neutrófilos y linfocitos, durante 1 a 5 días (periodo de incubación). Al mismo tiempo ocurre un descenso en la disminución del hematocrito y número de plaquetas (Estrada, 2004; Acha y Syfres, 1986).

Los equinos generalmente después de 1 a 5 días de la inoculación (período de incubación) desarrolla una fase febril benigna (fiebre moderada) que persiste por 2 a 5 días, siendo este el signo más temprano de infección, el animal se puede recuperar o progresar a un estado de pirexia severa (40.5 a 42 °C). El inicio es insidioso con inapetencia y excitabilidad leve, que enmascaran los signos; se presenta anorexia pronunciada, deshidratación, gran pérdida de peso y bruxismo, también pueden desarrollar diarrea ó cólico. Los signos encefálicos (se presentan entre los 4 y los 5 días del inicio de la infección, coincidiendo con la desaparición de la viremia y el regreso de la temperatura al rango normal. En ocasiones se presenta depresión del sistema nervioso central (Mesa y col, 2005; IICA, 2008).

Sin embargo dependiendo de las áreas del Sistema Nervioso Central que sean afectadas los signos clínicos son diferentes. Brito en 2008, en sus estudios sobre la EEV evalúa las lesiones en el cerebro de los equinos y su comportamiento durante el padecimiento y menciona tres áreas afectadas primordialmente. La primera es el hipotálamo, generalmente cuando esta área se encuentra dañada observamos cambios de comportamiento (apatía, desorientación, agresión, hiperexcitabilidad), posturas y movimientos anormales (marcha en círculos, presión de la cabeza, pleurotono), disminución de la capacidad visual o convulsiones. A diferencia del daño ocasionado en el cerebelo entonces el equino presenta disimetría, temblores, parado con las patas abiertas o ataxia truncal, por último si el vestíbulo se encuentra afectado los signos que presentara el animal son la cabeza inclinada, un animal que sufre caídas constantes y con estrabismo. Por lo tanto se hace necesaria una buena anamnesis y el empleo de la epidemiología y estudios de laboratorio para llegar a un diagnóstico acertado mediante la confirmación del agente causal (Brito y col., 2008; IICA, 2008).

Estos hallazgos pueden acompañarse de otros signos como pérdida de los reflejos cutáneos del cuello y de la respuesta visual, espasmos y fasciculaciones de los músculos faciales y apendiculares, pedaleo, movimientos de masticación, incoordinación, convulsiones u opistótonos. En algunos casos hay elevada excitación e hipersensibilidad al tacto y al sonido (Mesa y col., 2005; IICA, 2008).

Según Mesa *et al*, 2005 en équidos el cuadro clínico de la enfermedad varía según la severidad de la infección, la EEV tiene cuatro presentaciones:

a) Subclínica: sin signos aparentes, la infección es ocasionada por cepas enzoóticas

b) Moderada: enfermedad febril benigna (1 a 2 días), con anorexia y depresión, la viremia es baja o nula. Entre el 4° al 6° día aparecen anticuerpos neutralizantes y los animales se recuperan sin secuelas.

c) Severa pero no fatal: anorexia, fiebre alta, estupor, debilidad, tambaleo, ceguera y en ocasiones secuelas permanentes.

d) Fatal: con los signos señalados anteriormente, pero terminando con la muerte. No todos los casos fatales en équidos están acompañados por signos de tipo neurológico.

La enfermedad se puede interrumpir durante esta secuencia de signos, debido a que el sistema inmune reacciona formando anticuerpos para combatir la enfermedad y es posible que el animal se recupere. Sin embargo, cuando la enfermedad está muy avanzada, pueden entrar a la fase letárgica caracterizada por presionar la cabeza contra objetos sólidos posteriormente a la fase paralítica, donde se quedan inmóviles y rígidos o caminan en círculos hasta que caen, el pedaleo se puede observar en animales echados, no se pueden incorporar, posteriormente presentan un estado de profundo letargo y mueren pocas horas después de observarse los primeros signos clínicos de encefalitis (muerte súbita) o en el transcurso de 2 a 4 días después de que el animal cae (5 a 10 días pos infección) (Anishchenko, et al, 2005; Brito y col., 2008; SENASA, 2012).

Diagnóstico

Análisis post mortem.

Las lesiones macroscópicas de la EEV en caballos no son muy específicas, pueden inclusive no presentar lesiones en SNC o pueden exhibir necrosis generalizada con hemorragias. Se pueden observar focos de necrosis en

páncreas, hígado y corazón en los caballos infectados con este virus por lo que no es posible basar en ello nuestro diagnóstico final. El análisis microscópico del tejido cerebral generalmente es de diagnóstico presuntivo, la lesión común es inflamación grave de la materia gris, se puede observar degeneración neuronal, infiltración de las células inflamatorias, gliosis y hemorragias (Mesa y col, 2005; IICA, 2008).

El virus puede ser aislado de las secreciones nasales, oculares y de la boca, orina y leche. En la necropsia se observa equimosis y congestión de las membranas mucosas y superficies serosas, ocasionalmente se presenta hemorragias en los ganglios linfáticos, palidez del hígado y medula ósea, edema y congestión de las meninges (Estrada, 2004; Adams et al., 2012).

Las lesiones microscópicas de los órganos son variables en el SNC, las lesiones son generalizadas con hiperemia e infiltración perivascular variable y áreas de necrosis licuefactiva, las lesiones aparecen con más frecuencia en el área frontal de la corteza disminuyendo hacia el área occipital, las meninges presentan inflamación difusa con exudado celular compuesto principalmente de linfocitos. En la medula espinal hay gliosis focal o principalmente linfocitos (Estrada, 2004; Adams, et al., 2012).

Análisis de Laboratorio

Debido a que la signología, tanto en humanos como en animales, no es específica y no se ha informado de procedimientos o técnicas que nos orienten a un diagnóstico; la confirmación del diagnóstico definitivo, se realiza mediante procedimientos que implican el aislamiento e identificación viral, la detección del antígeno o de IgG e IgM específicas. Las muestras empleadas son: sangre completa, suero, líquido cefalorraquídeo (LCR) o tejidos; las cuales se deben

enviar congeladas si el tiempo de transporte es mayor a 24 horas, o refrigeradas si el tiempo es menor a éste. Adicionalmente se deben remitir tejidos como encéfalo, páncreas y bazo en formalina “buferada” al 10% para histopatología (Mesa y col., 2005; Adams y col., 2012).

El virus puede aislarse fácilmente de la sangre y de lavado o hisopado faríngeo. En los primeros días de la enfermedad se puede realizar el aislamiento mediante la inoculación de cobayos y ratones recién destetados, huevos embrionados de aves o cultivos celulares (Adams y col., 2012).

Para el diagnóstico serológico se puede usar las pruebas de fijación de complemento, inhibición de la hemaglutinación, neutralización y ensayo de inmunoabsorción de enzimas de captura de anticuerpos. Los anticuerpos neutralizantes y la inhibición de la hemaglutinación aparecen durante la primera semana de la enfermedad y los fijadores de complemento en la segunda semana (Morilla y Mucha, 1969).

Es necesario tomar en cuenta que la viremia ya pudo haber desaparecido en los animales con síntomas declarados, la misma dificultad se puede encontrar al intentar aislar el virus de muestras de animales muertos después de una enfermedad más o menos prolongada, por lo tanto es importante considerar también realizar la toma de muestras en animales asintomáticos. Un buen indicio de que se trata de la enfermedad es que la EEV tiene un carácter explosivo por lo tanto habrá gran cantidad de equinos enfermos y muertos, así como también casos febriles en humanos (Acha y Syfres, 1986).

Como se mencionó anteriormente las pruebas serológicas empleadas para ampliar la posibilidad de diagnóstico y observar la dinámica de la seroconversión, requieren de una buena historia clínica y de muestras pareadas provenientes de équidos asintomáticos en contacto con otros en estado febril, no vacunados

contra la EEV, o que registren una vacunación mayor a 90 días de aplicación; en un lapso de 5 a 10 días, se toman la que corresponderán al estado asintomático y al estado de convalecencia. De los équidos las muestras de tejidos se tomaran en el momento de presentar signos neurológicos graves en un periodo de 11 a 20 días pos infección (Acha y Syfres, 1986; Mesa y col., 2005).

Los antígenos virales se detectan durante los primeros 7 días (antes de la aparición de los signos), los anticuerpos se evidencian pasada la fase de viremia (a partir del séptimo día de infección). La IgM aparece 3 días después de los primeros síntomas y permanece detectable entre 70 y 90 días, indicando infección o vacunación reciente; la IgG se detecta desde el sexto día post infección natural, vacunación, o cuando desaparecen la IgM y puede durar elevada por meses o años, indicando infecciones antiguas. (Mesa y col., 2005; IICA, 2008).

Como ayuda diagnóstica se emplea la detección de anticuerpos contra EEV en especies diferentes a la équida (bovina y canina) para determinar la presencia de esta entidad en un área determinada (Mesa y col., 2005).

Aislamiento e Identificación Viral

El aislamiento viral se realiza entre los 5 y los 7 días después de la infección, las muestras se deben tomar durante la fase de viremia (primeros 5 días post infección) ya que ésta termina antes de la aparición de los primeros signos, (Mesa y col., 2005; Adams et al., 2012). En caso de que alguno de los animales no este presentado signos de enfermedad pero si existan casos de enfermedad febril en equinos en la región, es recomendable tomar muestras a la población susceptible en general para detectar a los individuos infectados y tomar medidas preventivas que disminuyan la diseminación del virus.

Las muestras empleadas son: suero sanguíneo de animales asintomáticos en contacto con otros en estado febril marcado, que se encuentren en lugares vecinos o estén en contacto estrecho con los casos clínicos. Tejidos en porciones de 2 g. de encéfalo, páncreas y bazo procedentes de équidos muertos en la fase sobreaguda, al inicio de la presentación de los signos nerviosos, o de un animal sacrificado durante el período febril (Acha y Syfres, 1986; Adams et al., 2012).

El examen histopatológico, ofrece un diagnóstico presuntivo de la entidad, debido a que las lesiones macroscópicas son difíciles de encontrar, tan solo en casos muy severos se pueden observar áreas de necrosis y hemorragias. En el SNC las lesiones más severas son vasculitis necrotizante severa, infiltración perivascular, gliosis focal y difusa que se localizan en la corteza cerebral, tálamo y cuerpo estriado son menos intensas en las regiones caudales del SNC. Se puede observar edema cerebral, se presenta de áreas de linfocitos con algunos polimorfonucleares neutrófilos, infiltración de polimorfonucleares vasculitis y hemorragias; meningo encefalitis difusa, reducción de los elementos mieloides de la médula ósea y linfoideas del bazo y ganglios linfáticos, (Scherer, 1964; Acha y Syfres, 1986; Adams et al., 2012).

En el LCR de equinos se ha demostrado pleocitosis con linfocitos y polimorfonucleares, glucorraquia normal o hiperglucorraquia e hiperalbuminorraquia. Los análisis de LCR de casos humanos generalmente se presentan normales o con un ligero aumento de la celularidad y las proteínas (Mesa y col., 2005).

Debido a la especificidad de estos procedimientos, el tiempo de realización y el costo es importante por lo tanto considerar que se pueden utilizar guías de enfoque diagnóstico, en este caso los cambios presentados en la sangre tanto en equino con síntomas como asintomáticos por medio de herramientas básicas como la biometría hemática autores como Acha y Syfres, 1986 y Mesa y col., en

2005; describen algunos cambios durante la infección del equino sin especificar el momento en que se dio. Detectar estos cambios podría facilitar la detección de la etapa de viremia disminuyendo el tiempo y los costos diagnósticos, acelerando el procedimiento de aislamiento viral.

Medidas de Prevención

La OPS / OMS, recomienda planes de prevención y control de enfermedades de transmisión vectorial, basados en los siguientes aspectos: establecimiento de un programa integral de prevención y control que incluya: vigencia de una norma o base legal, planes de capacitación para el personal de salud, programa de divulgación y de educación sanitaria, control de calidad de vacunas, seguimiento y evaluación de las actividades de vacunación, atención oportuna de focos y su control, montaje y mantenimiento de un sistema de información y vigilancia epidemiológica con diagnóstico de laboratorio, control de la movilización de animales domésticos susceptibles, coordinación intersectorial, investigación, control de vectores, y participación comunitaria (SENASA, 2012).

La capacitación es una medida preventiva y de suma importancia, ya que en Centro y Sur de América las Encefalitis Equinas se habían olvidado hasta su reemergencia. Las instituciones universitarias pueden jugar un importante papel en lo que tiene que ver con la organización de cursos cortos, educación no formal y educación de postgrado (Acha y Syfres, 1986).

Inmunización

Para efectuar un adecuado control de las epidemias se deben tomar medidas específicas, las cuales se acompañan de una infraestructura de vigilancia y

control de los biológicos utilizados y planes continuos de inmunización a toda la población de équidos susceptibles; esta es la mejor estrategia de prevención y control de EEV, se dirige prioritariamente hacia las áreas de circulación endémica, que por sus características ecológicas son las de mayor riesgo para el desarrollo y presentación de brotes. La intervención inmediata es necesaria para prevenir posibles problemas sanitarios (IICA, 2010; SENASA, 2012).

En muchas áreas del continente se ha utilizado la vacuna TC-83, cepa viva atenuada para combatir la enfermedad durante las epizootias y como medida preventiva en zonas no epizoóticas, pero con alto riesgo de infección. La vacunación perifocal de équidos en las áreas de cuarentena debe ser inmediata. La definición de las áreas a vacunar se realiza bajo la dirección de los programas de Sanidad Animal, propios de cada país (Adams et al., 2012; Acha y Syfres, 1986).

La vacunación en áreas de riesgo con vacuna atenuada TC-83 de la Empresa Colombiana de Productos Veterinarios (VECOL), ha generado una adecuada protección en el 90% en los équidos. La vacuna confiere inmunidad a los 3 o 4 días post-inoculación y los anticuerpos pueden perdurar por dos a tres años, con lo cual se mitiga o controla la principal fuente de virus para los mosquitos y se previenen futuras epidemias con las pérdidas económicas que éstas conllevan. Las reacciones secundarias por el uso de la vacuna son poco frecuentes (Adams et al., 2012).

La vacunación con virus atenuado o la infección con una variante, produce anticuerpos neutralizantes y protección cruzada para la infección con otros subtipos del agente viral.

En 1971 en Texas, durante una epidemia declarada, la vacunación con virus vivo atenuado TC-83, detuvo el avance de la enfermedad que comenzó en 1969, hacia

otras regiones de Estados Unidos, esta vacuna corresponde a las vacunas elaboradas a partir de virus vivo modificado y atenuado que a diferencia de las usadas en América Latina que son vacunas inactivadas monovalentes para équidos, elaboradas en embrión de pollo con cepas virulentas de EEV y con inactivantes de primer orden, y en algunas incluso se usan cepas de campo originarias de los brotes actuales, han implicado riesgo, ya que con frecuencia contienen virus vivo residual, éste se puede multiplicar en los équidos y originar brotes de EEV (Acha y syfres, 1986).

La viremia que produce la vacuna atenuada es de bajo nivel, insuficiente para infectar mosquitos. Aun así, no se debe usar en áreas donde la enfermedad es desconocida (Adams et al., 2012).

En algunos países la cobertura de vacunación es bastante irregular, varía de un área a otra, por la inexistencia de programas, o por falta de instituciones oficiales y organizaciones de productores plenamente comprometidas y claramente responsabilizados de dicha actividad; también los problemas logísticos relacionados con la adquisición del biológico generan un aumento apreciable de la población de équidos susceptibles, lo cual constituye un serio riesgo (SENASA, 2012).

Los planes de inmunización pueden fallar por diversas situaciones en estos casos se pone en riesgo el desarrollo de una respuesta óptima para controlar la situación (García, 2002; SENASA, 2012).

Desde que la EEV se presentó en el continente, se han venido elaborando y utilizando vacunas inactivadas para tratar de controlar la enfermedad, pero sin que hasta la fecha existan los requerimientos de norma formulados por alguna institución, en la actualidad solo se conocen las recomendaciones para producción de vacunas contra EEV iniciativa de la Oficina Panamericana de la Organización

Mundial de la Salud, con la finalidad de resolver el grave problema de la falta de control en la producción de las vacunas inactivadas (Batalla, 2001).

Los dos ciclos son independientes; algunas hipótesis consideran que el ciclo epizootico se mantendría por una transmisión de bajo nivel durante la estación seca entre équidos y vectores epizooticos sobrevivientes, o entre el animal huésped y las especies de mosquitos (que se alimentan de él) que son resistentes a las sequías. No se puede descartar la posibilidad de otros mecanismos en el origen y mantenimiento del virus, ya que éste podría aparecer por factores desconocidos (Diana, 2009; Mesa y col., 2005).

Se sospecha de la existencia de circulación de virus de EEV en la región de Minatitlán. Actualmente no existen reportes acerca del periodo que tardarían los animales en resultar infectados con éste virus después de ser expuestos a los vectores endémicos en la región. Existen varias formas de determinar la infección por EEV; la detección viral y la detección de anticuerpos IgM o IgG. Sin embargo, estos métodos tienen ciertas limitaciones como herramienta de diagnóstico y se requiere de métodos auxiliares para realizar un diagnóstico presuntivo que recorte el tiempo de espera. La detección viral se puede realizar únicamente durante el periodo de viremia, entre los días 7 y 12 post infección. Pero como al introducir un animal a una región de circulación viral no se conoce el momento en que se produce la infección, para detectar al virus en el paciente se tienen que tomar muestras sanguíneas diariamente y enviarlas a un laboratorio especializado para realizar pruebas como cultivo celular o PCR. Lo cual puede resultar costoso e impráctico.

Por otro lado el diagnóstico a través de pruebas serológicas no puede realizarse hasta después de que la respuesta inmune adquirida haya tenido oportunidad de montarse, para lo que se requieren aproximadamente 15 días pos infección. Una forma en que se podría reducir el tiempo de espera y hacer un diagnóstico

presuntivo temprano, sería realizar una evaluación diaria de los parámetros sanguíneos para identificar los cambios que ocurren durante la infección temprana cuando el sistema inmune innato intenta controlar la infección.

Durante este periodo se podrían apreciar cambios como linfocitosis, neutrofilia, linfopenia principalmente aunque este estudio de sangre no determina el tipo de enfermedad es, los cambios en estos parámetros nos ofrecen una guía de diagnóstico para enfermedades virales esto nos permite realizar la programación del momento en el que deberían realizarse los estudios de búsqueda de virus y de anticuerpos.

Por lo que en este trabajo se pretende utilizar la biometría hemática como auxiliar para determinar de manera temprana, en un modelo equino asintomático, el período en el que animales inmunológicamente susceptibles adquieren la infección por el virus de EEV en una región donde se sospecha se encuentra en circulación el virus de la EEV.

III. Justificación

Los arbovirus son entidades zoonóticas que cumplen ciclos en la naturaleza, con la participación de vertebrados silvestres y mosquitos vectores, de amplia distribución geográfica. Son capaces de producir epidemias en humanos y animales susceptibles con grados variables de morbilidad y letalidad en su población. Por lo tanto es preciso disponer de metodologías idóneas que permitan un diagnóstico presuntivo que sea rápido y sencillo.

Existen varias formas de determinar la infección por EEV, las cuales para ser validas necesitan el aislamiento viral o la detección de anticuerpos IgM o IgG, sin embargo estos métodos limitan nuestro diagnóstico cuando nos enfrentamos a brotes repentinos de la enfermedad en zonas de recursos limitados o con personal con poca experiencia y es casi imposible detectar el momento exacto en que se producirá la viremia para detectar el virus o los anticuerpos. Sin embargo, es posible realizar un diagnóstico presuntivo a través de la evaluación de los parámetros sanguíneos con la técnica de biometría hemática, que nos proporcionan una guía para identificar los cambios que ocurre durante la infección temprana en animales sintomáticos o asintomáticos, el material y equipo para esta prueba es de fácil acceso además de proporcionar la muestra necesaria para concluir el diagnóstico a través de la identificación del virus o anticuerpos específicos.

IV. Hipótesis

La biometría hemática es una prueba auxiliar que permite realizar un diagnóstico presuntivo en animales sospechosos de estar infectados con EEV durante la etapa temprana de infección.

V. Objetivos

Predecir a través de cambios en la biometría hemática, el momento en que se presenta la viremia de EEV en equinos inmunológicamente susceptibles en una región geográfica donde se sospecha la circulación del virus de la EEV.

Objetivos específicos

Realizar biometrías hemáticas en cada una de las unidades experimentales (equinos) como prueba de apoyo para el diagnóstico de EEV.

Demostrar las diferencias hematológicas de los equinos antes y después de la infección por EEV.

Evaluar el cuadro clínico de los equinos infectados con parámetros como: temperatura, estado físico general del animal y estado de ánimo.

VI. Material y métodos

Biológico:

- Sujetos de estudio: 7 equinos criollos hembras

Material:

- Material de curación:
 - Gasas estériles
 - Aguja de extracción de muestreo de 21 G x ½”, 0.80mm x 38 mm
 - Yodo
 - Alcohol
 - Guantes

- Material de contención
 - Amartigones
 - cuerdas de sujeción

- Material para biometría hemática:
 - Portaobjetos
 - Tubos vacutainer con EDTA y citrato de sodio
 - Gradillas
 - Tinción Diff-Quick
 - Aceite de inmersión para objetivo 100X
 - Microscopio óptico
 - Analizador automático para biometría hemática Kontrol-Lab

“Análisis hematológicos en equinos infectados naturalmente con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Minatitlán, Veracruz”.

Para la realización del proyecto se buscaron 7 equinos hembras de entre 1 y 2 años de edad negativas al virus de la EEV demostrado por las técnicas de HI (Inhibición de la hemaglutinación) y PNRT (Prueba de Neutralización de la Reducción de Placa). El manejo de dichos animales para la toma de muestras se desarrolló en paralelo a la fase experimental.

Durante un proceso de pre-exposición que duro 2 semanas los equinos se situaron en una pradera cercada, libre de ectoparásitos y aislados de otros animales, fueron sometidos a un examen físico general, un estudio hemático y una examen coproparasitológico obteniendo de esta forma datos sobre el estado de salud a priori de cada una de las unidades experimentales (ver cuadro 2).

Cuadro 2. Referencias de biometrias hematicas pre exposición.												
EQUI	Globulos blancos 10 ³ /uL	Linfocitos 10 ³ /uL	Monocitos 103/uL	Neutrofilos en banda 103/uL	Neutrofilos segmentados 103/uL	Eosinofilos 103/uL	Basofilos 103/uL	Globulos rojos 10 ⁶ /uL	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	Volumen corpuscular medio fl	Plaquetas 10 ³ /uL
1	15.5	8.5	0	0	6.5	0	0	7.6	113	34	44	907
2	13.6	5.4	0	1.65	6.5	0.2	0	7.6	103	31	40	*
3	14.8	7.2	0.6	1.7	6.5	0	0	6.2	106	32	51	*
4	23.5	11.5	0.2	5.3	6.5	0.3	0	8.7	103	31	35	*
5	13.8	6	0	4.1	6.5	0.37	0	7	113	34	48	*
6	14.8	7.2	0	7	6.5	0.3	0.1	6.2	106	32	51	*
7	10	3.6	0.1	2.1	6.5	0.8	0.2	6.3	103	31	49	*

Nota: * El contador automatico no arroja ningun valor

De igual forma se obtuvieron muestras de suero para pruebas serológicas de HI (inhibición de la hemaglutinación) y PNRT (Prueba de neutralización por reducción de placas), con alto grado de especificidad y sensibilidad dirigidas a la identificación de la hemaglutinina viral del virus de la EEV, que se realizaron en laboratorios de alta seguridad BSL-3 por nuestros colaboradores en la Universidad

de Texas Rama Médica en Galveston Texas (UTMB), reconfirmando la seronegatividad de las unidades experimentales.

Los resultados obtenidos de las biometrías hemáticas se compararon con las tablas de referencia Merck's, 2014 y los resultados obtenidos de los mismos equinos pre exposición, de esta forma con las pruebas copropositológicas y pruebas de HI y PNRT se concluyó que los siete equinos antes de la exposición al vector se encontraron en un estado de salud aceptable para la etapa experimental.

HEMATOLOGIC REFERENCE RANGES IN HORSES		
	Conventional (USA) units	HORSES
PCV (hematocrit)	%	27 – 43 c
Hemoglobin (Hgb)	g/dL	10 – 16
Red blood cells	X 10 ⁶ /uL	6.0 – 10.4
Reticulocytes	%	0
Mean corpuscular volume	fL	37 – 49
Mean corpuscular Hgb	pg	13.7 – 39.3
Mean corpuscular Hgb concentration	g/dL	35.3 – 39.3
Platelets	X 10 ³ /uL	117 – 256
White blood cells	X 10 ³ /uL	5.6 – 12.1
Neutrophils	%	52 – 70
(segmented)	X 10 ³ /uL	2.9 – 8.5
Neutrophils	%	0 – 1
(band)	X 10 ³ /uL	0 – 0.1
Lymphocytes	%	21 – 42
	X 10 ³ /uL	1.2 – 5.1
Monocytes	%	0 – 6
	X 10 ³ /uL	0 – 0.7
Eosinophils	%	0 – 7
	X 10 ³ /uL	0 – 0.8
Basophis	%	0 – 2

“Análisis hematológicos en equinos infectados naturalmente con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Minatitlán, Veracruz”.

	X 10 ³ /uL	0 – 0.3
Myeloid/erythroid ratio		0.5 -1.5:1
Plasma proteins e	g/dL	6.0 – 8.5
Plasma fibrinogen	g/dL	0.1 – 0.4

Obtenidos los individuos para el experimento, el 29 de julio de 2014, se identificó macroscópicamente a cada individuo con un número progresivo del 1 al 7 mediante un rasurado de pelo en la región costal izquierda.

El primero de agosto se programaron con el software OneWireViewer un total de 14 chips Thermochron iButton, dos para cada animal los cuales serían colocados subcutáneamente en la región inguinal izquierda. Estos chips tienen la capacidad de medir la temperatura del animal a intervalos de 30 min, de esta forma era posible monitorear las variaciones de temperatura y determinar el momento exacto cuando alguno de los individuos presentara fiebre.

Un día después a la implantación de los chips los individuos fueron trasladados de acuerdo a las estipulaciones marcadas en la NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización de animales, del Valle de Toluca, Estado de México, a la Cuenca de Río Coatzacoalcos, ciudad de Minatitlán en el estado de Veracruz, en un camión especial para transporte de animales grandes, cubriendo sus necesidades de agua y descanso durante el viaje. Llegando a Minatitlán la madrugada del 1 de agosto de 2014 se descargó a los equinos ubicándoles inmediatamente en el área de exposición al vector que se adaptó y cerco previamente a la llegada de los animales. Es importante destacar que esta área se encuentra rodeada por abundantes pantanos a los cuales los equinos no tienen acceso pero son eficientes criaderos de mosquitos, a sus alrededores se encuentran áreas dedicados a la práctica de agricultura y ganadería, y por encontrarse dentro de la selva permite a los equinos una mejor exposición al vector.

Transcurridas 12 horas, se inicia la inspección del estado general de salud encaminándolos a un pequeño corral que facilita la inspección y toma de muestras de los individuos, al mismo tiempo que realizaba la búsqueda intencional de casos sospechosos según lo descrito por IICA en 2010, es decir, animal afectado por el virus de la EEV que después de la exposición presente Síndrome Neurológico, con signos y síntomas que incluyen, entre otros, fiebre, depresión profunda, anorexia, anemia, somnolencia, tambaleo al caminar, torneo, caída del labio inferior y/o parálisis.

El monitoreo de los animales se ajustó para realizarlo diariamente entre las 7:00 y 8:00 am, que son la horas más frescas y con luz que coadyuvan al manejo y la toma de muestras. Este último proceso se realizó haciendo una desinfección previa del canal yugular con alcohol, posteriormente se insertó una aguja hipodérmica a través del canal para hacer la punción de la vena yugular, y obtener la muestra de sangre que pasaría directamente al tubo con EDTA; previamente etiquetado con la fecha, hora de la toma de muestra y número de identificación del individuo. Las muestras se almacenaban a 4°C para ser transportadas al Laboratorio de diagnóstico clínico para humanos ubicado en el centro de Minatitlán.

Las muestras de sangre resguardadas en tubos de EDTA fueron procesadas a través del equipo analizador automático Kontrol-Lab, para realizar un conteo rápido y preciso de las células sanguíneas, creando una orientación diagnóstica y pronóstica más fiable y en menor tiempo, considerando que las condiciones climáticas pueden afectar el resultado real si el procedimiento demora. Esta técnica automatizada se complementó con la realización de un frotis sanguíneo por la técnica con tinción de Diff-Quick, que permite destacar la morfología y diferenciación de las células sanguíneas.

La información obtenida durante 21 días consecutivos se almacenó en una base de datos creada con el programa de MICROSOFT EXCEL. De esta forma podían ser evaluados cada uno de los componentes celulares de la sangre, enfocándonos en el resultado obtenido y no en las variaciones generadas por el tiempo de procesamiento. La información obtenida antes, durante y después de la fase experimental del proyecto, permitió la evaluación de los componentes sanguíneos y su reacción dentro del organismo equino ante la infección del virus de la EEV.

Al día 25 del experimento se retiró a cada uno de los individuos los chips de temperatura, para su lectura se empleó una computadora programada para la lectura de chips con adaptador USB y el software OneWireViewer, la información se almacenó en una base de datos con el programa de MICROSOFT EXCEL y fue analizada mediante ANOVA.

VII. Límite de espacio y tiempo

Estado: Veracruz

Municipio: Minatitlán

Ejido Tacoteno

Coordenadas: N20° 57` 90.50; W97°27` 92.70

Características ecológicas:

Su territorio abarca un área de 71,826 km² en el que con clima cálido húmedo y una estación seca corta. Su temperatura media anual es de 28°C con lluvias abundantes en verano y principios de otoño, mayo junio son las épocas de mayor calor con temperaturas de hasta 42 a 44°C a la sombra, la temperatura mínima promedio es de 13°C y se presenta en el mes de enero. La variación en la temperatura anual está alrededor de 6.4°C. Tiene precipitaciones la mayoría de los meses alcanzando de 3,000 a 4,000 mm anuales y cuenta con abundantes corrientes fluviales (INEGI, 2014).

Durante el verano 2014, se presentó en las costas del Golfo de México el cuarto ciclón tropical “Dolly”, que durante su evolución se presentó con lluvias intensas y ráfagas de viento de hasta 50 km por hora. La zona de exposición se encontraba dentro de la selva, y rodeada por áreas de trabajo dedicadas a la agricultura, ganadería y zonas pantanosas. Estas características no solo propician las condiciones de temperatura y humedad para la reproducción de mosquitos aumentando su potencial de distribución.

“Análisis hematológicos en equinos infectados naturalmente con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Minatitlán, Veracruz”.

El trabajo se realizó en el verano de 2014; considerando que para la elaboración de este documento se incluyó la información más relevante. Se destaca un cronograma con las actividades más relevantes para esta investigación.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES 2014									
	Abr	May	Jun	Jul	Ago.	Sep	Oct	Nov	Dic
Adaptación del potrero experimental	X	X	X	X					
Identificación de unidades experimentales por rasurado		X	X						
Biometría hemática y estudio coproparasitológico pre exposición				X					
Toma de muestras de suero sanguíneo para prueba de HI y PNRT				X					
Colocación de chips subcutáneos				X					
Traslado de unidades experimentales al potrero				X					
Toma y análisis de muestras de sangre y suero				X	X				
Recolección de datos sobre biometrías hemáticas				X	X	X			
Análisis de información						X	X		
Comparación e Interpretación de resultados							X	X	X

I. Resultados

Biometría hemática

Al hacer el análisis general de las biometrías hemáticas se utilizó como referencia los parámetros hematológicos en caballos postulados por Merck en 2014.

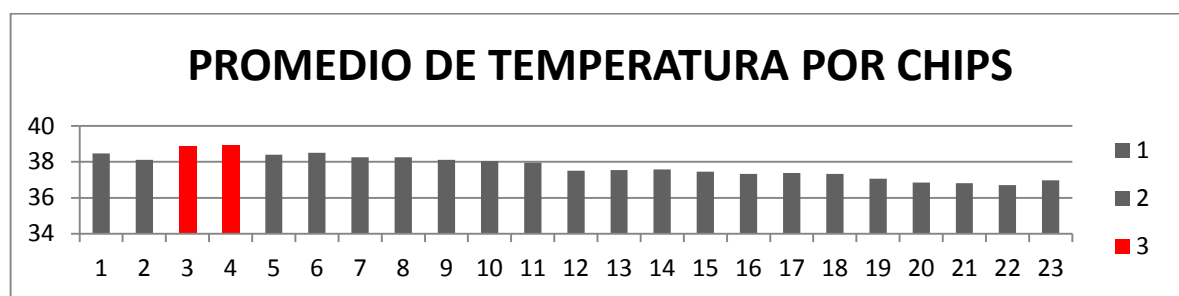
La mayoría de los caballos presentaban cambios significativos después de las 72 horas post exposición. Los cambios en la serie roja fueron: 1) En conteo de glóbulos rojos se observó una disminución parcial a partir del primer día de exposición, 2) la hemoglobina mostró un descenso ligero a partir del tercer día de exposición y 3) la concentración media de hemoglobina empezó a elevarse del cuarto al séptimo día, el parámetro alcanzó niveles normales al día ocho.

El hematocrito, hemoglobina corpuscular media y volumen corpuscular medio, no sufrieron cambios significativos para esta evaluación, puesto que no se encontraron variaciones fuera de los límites establecidos.

En la línea celular blanca los cambios normalmente inician a las doce horas pos exposición, 80% de los equinos presentaron, a saber: 1) Leucocitosis marcada hasta el 3er día. Posteriormente entraron en periodo de normalización por 9 días, para volver a incrementarse al día 12, con una elevación máxima el día 17; 2) Los linfocitos se elevaron al tercer día, pero no es un cambio significativo, pues 24 horas después regresan a su rango normal y se mantuvieron de esta forma el resto del experimento. 3) Se presentó una neutrofilia con desviación a la izquierda en todo el experimento. Otras células como los eosinófilos tuvieron dos picos de elevación en los días 3 y 14, para posteriormente regularse. Los monocitos y basófilos no mostraron cambios significativos en este estudio. La serie plaquetar se mantuvo siempre elevada. Estos resultados se pueden apreciar en la tabla de resultados generales en el anexo 1.

Temperatura

La temperatura se midió en dos formas la primera con chips los cuales permitieron constatar que hubo un incremento los días 3 y 4 en promedio sin embargo fueron los equinos 2 y 6 quienes presentaron las fiebres más elevadas y por más días con hasta 2 grados por encima de los normal de 38.5.



*Las barras en rojo representan los días en que la temperatura de los equinos fueron más elevadas

Utilizando en método de temperatura rectal observamos que los días promedio de temperatura elevada son los días 12 y 13 coincidiendo con las fechas de aislamiento viral, el equino 6 fue el animal más representativo en este método presentado los más altos picos febriles. El virus de la EEV fue aislado del 93% (6/7) de los animales.

Resultados individuales

Equino 1: Observaciones clínicas: El animal presento una respiración acelerada y una ligera elevación de la temperatura en los primeros días de exposición esta fiebre es marcada los días 3, 14 y 17 con 38.9°C, 39.2°C, y 39.1°C coincidiendo estos últimos días con el aislamiento viral.

A la realización de las biometrías hemáticas se observó cómo los glóbulos blancos durante la fase de exposición presentan elevaciones importantes los días 2, 5 y 19

“Análisis hematológicos en equinos infectados naturalmente con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Minatitlán, Veracruz”.

con 13.4, 13.3 y 14,3 respectivamente, que en comparación al rango utilizado en la tabla de Merck que es de 5.6 – 12.1, representaría una leucocitosis.

Los linfocitos, durante el periodo de estudio, se encontraron dentro del rango de valores indicado por Merck (1.2 a 5.2) exceptuando el día 6 con 23.1 y 7 con 25.4, cuyas elevaciones sobrepasan incluso el valor máximo de referencia (8.5) indicando una linfocitosis marcada. Se presentó una monocitosis los días 2 y 13 con 1.07 y 8.2 respectivamente.

En la serie roja el conteo de glóbulos rojos y hematocrito se encontró disminuido todo el experimento este se hace más evidente a partir del día 8, cuando también empieza a disminuir la hemoglobina, y se observa trombocitosis continua.

Biometría hemática Equino 1														
Día	Conteo de glóbulos blancos 10 ³ /uL	Conteo de linfocitos 10 ³ /uL	Monocitos 103/uL	Neutrofilos en banda 103/uL	Neutrofilos segmentados 103/uL	Eosinofilos 103/uL	Basofilos 103/uL	Conteo de glóbulos rojos 10 ³ /uL	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	Volumen corpuscular medio fL	Hemoglobina corpuscular media pg	Concentración media de hemoglobina corpuscular g/dL	Conteo de plaquetas 10 ³ /uL
1	13.1	4	0	0	0	0	0	5.09	10.5	211	415	20.6	49.7	1208
2	13.4	4.4	1.07	3.08	4.02	1.07	0	6.49	11.3	28.8	44.4	17.4	39.2	1414
3	11.6	4.4	0.2	4.8	1.2	1.16	0	5.79	11.3	25.2	43.6	19.5	44.8	*
4	14	4	0.28	7	1.12	1.4	0	5.18	10.5	22.3	43.1	20.2	47	*
5	13.3	4.6	0.53	2.52	0.79	0.66	0.13	5.12	10.5	22	43	20.5	47.7	*
6	11.3	23.1	0.22	3.72	0.67	1.46	0.11	5.13	10.1	22.2	43.3	19.6	45.4	*
7	10.4	25.4	0.1	3.84	1.14	0.31	0	5.65	10.1	24.8	43.9	18.2	41.5	1109
8	10.1	2.6	0	3.23	1.31	0.4	0	5.72	9.9	25.1	44	17.3	39.4	995
9	11.7	3	0.11	2.92	1.28	0.46	0	5.44	9.9	23	43.6	18.1	41.7	*
10	6.7	1.5	0.13	2.01	1.07	0.6	0	5.11	9.1	22.2	43.5	17.8	40.9	877
11	6.2	1.6	0	2.66	0.12	0.18	0	4.44	8	18.9	42.7	20	47	*
12	10	4.4	0.7	3.5	0.3	0.9	0	4.75	9.1	20.4	43	19.1	44.6	*
13	8.2	1.9	8.2	3.52	0.49	1.23	0.16	5.06	9.1	21.9	43.3	17.9	41.5	*
14	10.8	2.9	0.1	3.56	0.43	1.94	0	4.37	9.4	20.6	47.3	21.5	45.6	*
15	12.1	3.4	0.36	3.17	0.48	2.19	0	4.66	9.7	22.3	47.9	20.8	43.4	*
16	11	3.1	0.13	3.41	0.22	2.2	0	4.12	8.9	19.4	47.3	21.6	45.8	*
17	12.2	3.8	0.36	4.63	1.22	0.36	0	5.05	10.2	24.3	48.2	20.1	41.9	*
18	11.5	3.3	0.11	3.1	1.72	1.26	0	5.1	9.5	24.8	48.7	18.6	38.3	971
19	14.9	4.1	0	0	0	0	0	4.69	9.9	22.4	47.9	21.1	44.1	*
20	13.1	4	0.26	3.14	1.83	0.78	0	5.05	9.5	24.4	48.5	18.8	38.9	986
21	12.9	4.1	0.77	2.45	2.95	0.64	0	4.65	8.6	22.5	48.9	18.4	38.2	728
Valores normales de Merck														
Conteo de glóbulos blancos 103/uL: 5.6-12.1				Neutrofilos en banda 103/uL: 0-0.1				Basofilos 103/uL: 0-0.3				Volumen corpuscular medio fL: 37-49		
Conteo de linfocitos 103/uL: 1.2-5.1				Neutrofilos segmentados 103/uL: 2.9-8.5				Hemoglobina g/dL: 10-16				Hemoglobina corpuscular media pg: 13.-39.3		
Monocitos 103/uL: 0-0.7				Eosinofilos 103/uL: 0-0.8				Hematocrito %: 27-43				Concentración media de hemoglobina corpuscular g/dL: 35.3-39		
												Conteo de plaquetas 103/uL: 117-256		

Equino 2: El equino no mostró comportamiento nervioso, hasta el cuarto día de exposición cuyos signos de agotamiento y debilidad eran evidentes, se presentó una fiebre de hasta 40°C a partir del día 3 de exposición

“Análisis hematológicos en equinos infectados naturalmente con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Minatitlán, Veracruz”.

Se presenta una leucocitosis los días 14, 16 y 17 con 14.7, 14.1 y 14.3 respectivamente con ligera linfocitosis los días 2 y 3. Durante todo el experimento se observó una neutrofilia con desviación a la izquierda, que es marcada los primeros tres días del experimento y del 12 al 21 días exposición. Los glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito se ven disminuidos a partir del día 4 y continúan en descenso hasta el término de la fase experimental.

Biometra hemática Equino 2

Día	Conteo de glóbulos blancos 10 ³ /uL	Conteo de linfocitos 10 ³ /uL	Monocitos 103/uL	Neutrófilos en banda 103/uL	Neutrófilos segmentados 103/uL	Eosinófilos 103/uL	Basófilos 103/uL	Conteo de glóbulos rojos 10 ⁶ /uL	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	Volumen corpuscular medio fL	Hemoglobina corpuscular media pg	Concentración media de hemoglobina corpuscular g/dL	Conteo de plaquetas 10 ³ /uL
1	11.7	4.9	0	0	0	0	0	6.15	10.1	43.4	43.4	16.4	37.9	1003
2	15	5.3	0.45	3	4.5	0.6	0.3	6.36	10.7	28.8	45.3	16.8	37.1	903
3	13.2	5.8	0.26	3.5	1.5	0.13	0.13	6.26	10.7	28.2	45.2	17	37.9	994
4	8.5	2.9	0.42	2.29	0.68	0.42	0	5.34	9.5	23.7	44.4	17.7	40	846
5	8.6	3.5	0	0.86	0.43	0.08	0	4.95	9.7	21.5	43.6	19.5	45.1	*
6	7.3	2.8	0.07	1.53	0.43	0.14	0	5.45	9.9	24	44.1	18.1	41.2	917
7	7.3	3	0.43	1.32	0.29	0.21	0	4.98	9.4	21.7	43.7	18.8	43.3	909
8	8.3	2.9	0.16	1.74	0.41	0.24	0.08	5.64	8.9	25.2	44.8	15.7	35.3	733
9	9	3.3	0.18	1.62	0.3	0.45	0	5.45	9.3	24.1	44.4	17	38.5	827
10	8.9	3.4	0.53	2.67	0.35	0.533	0.08	5.02	8.9	21.9	43.8	17.7	40.6	810
11	5.3	1.7	0.21	1.43	0.05	0.26	0	5.18	9.5	22.7	44	18.3	41.8	814
12	13.3	4.5	0.26	5.45	0.39	0.66	0	5.04	9.5	21.8	43.4	18.8	43.5	*
13	5.1	1.2	0.1	2.14	0.15	0.3	0	5.12	9.3	22.6	44.3	18.1	41.1	749
14	14.7	5.8	0.14	5.29	0.29	0.73	0	5.48	10.1	27.2	49.7	18.4	37.1	883
15	13.2	4.8	0.13	5.67	0.79	0.13	0	5.54	10.2	27.5	49.8	18.4	37	915
16	14.1	4.2	0.7	5.35	0.56	0.7	0	4.9	9.5	24.4	48.9	19	38.9	920
17	14.3	4.8	0	5.72	2.14	0.42	0	5.2	9.7	25.5	49.1	18.6	38	963
18	10.5	3	1	2.1	0.42	0.31	0	5.2	9.7	25.7	49.6	18.6	37.7	791
19	13.4	4.4	*	*	*	*	0	4.97	9.7	24.2	48.8	19.5	40	996

Valores normales de Merck

Conteo de glóbulos blancos 10 ³ /uL: 5.6-12.1	Neutrófilos en banda 103/uL: 0-0.1	Basófilos 103/uL: 0-0.3	Volumen corpuscular medio fL: 37-49
Conteo de linfocitos 103/uL: 1.2-5.1	Neutrófilos segmentados 103/uL: 2.9-8.5	Hemoglobina g/dL: 10-16	Hemoglobina corpuscular media pg: 13-39.3
Monocitos 103/uL: 0-0.7	Eosinófilos 103/uL: 0-0.8	Hematocrito %: 27-43	Concentración media de hemoglobina corpuscular g/dL: 35.3-39.3
Conteo de plaquetas 103/uL: 117-256	*: el valor no existe		

Equino 3: Clínicamente no se observaron cambios significativos el comportamiento. La temperatura mostró ligeras variaciones que coincidieron con las horas calurosas del día, sin mostrar ningún patrón importante.

Los glóbulos blancos, durante todo el experimento, se presentaron dentro del rango proporcionado Merck. Se presenta una monocitosis el día 21. Los eosinófilos y basófilos no representan cambios significativos.

“Análisis hematológicos en equinos infectados naturalmente con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Minatitlán, Veracruz”.

Microscópicamente la serie roja se ve afectada a partir del 5 día de exposición con la disminución de hemoglobina, hematocrito acompañados de una trombocitosis.

Biometria hematica Equino 3														
Día	Globulos blancos 10 ³ /uL	Conteo de linfocitos 10 ³ /uL	Monocitos 10 ³ /uL	Neutrofilos en banda 10 ³ /uL	Neutrofilos segmentados 10 ³ /uL	Eosinofilos 10 ³ /uL	Basofilos 10 ³ /uL	Conteo de globulos rojos 10 ⁶ /uL	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	Volumen corpuscular medio fL	Hemoglobina corpuscular media pg	Concentración media de hemoglobina corpuscular g/dL	Conteo de plaquetas 10 ³ /uL
1	10.7	4.6	0	0	0	0	0	6.22	10.4	26.9	43.4	16.7	38.6	903
2	10.7	4.5	0.1	2.78	1.81	1.07	0	6.61	10.5	24.9	44.5	18.7	42.1	860
3	9.7	4.3	0	4.07	0.38	0.87	0	6.34	10.5	28.7	45.4	16.5	36.5	753
4	9.2	3.7	0.79	0.93	0.37	0.83	0	5.77	10.1	25.8	44.8	19.5	39.1	705
5	9.3	3.1	0.09	2.4	0.5	0.46	0.09	5.34	9.5	23.5	44.1	17.7	40.7	819
6	7.1	2.8	0	1.2	0.4	0.3	0	5.29	9.1	23.4	44.4	17.2	38.8	688
7	6.4	2.2	0.19	1.53	0.83	0.12	0.06	5.21	9.2	22.9	44.1	17.6	40.1	622
8	7.6	3	0.07	1.67	0.38	0.22	0	5.64	8.7	25.2	44.8	15.4	34.5	609
9	7.2	2.7	0.14	1.22	0.21	0.07	0	5.41	8.7	24.1	44.6	16	36	827
10	6.7	2.8	0.6	0.73	0	0.46	0.13	5.12	8.3	22.8	44.6	16.2	36.4	541
11	8.3	3.1	0	2.49	0.24	0.66	0	5.46	8	24.4	44.8	15.9	35.6	546
12	9.2	5.3	0	2.2	0.09	0.09	0	4.54	8.3	19.6	43.3	18.2	42.3	778
13	8.6	3.4	0.43	1.89	0.43	0.08	0	5.1	8.3	22.6	44.5	16.2	36.7	555
14	9.1	3.7	0.45	2.54	0.18	0.45	0	4.61	8.9	22.5	49	19.3	39.5	630
15	11.1	3.7	0	4.1	0.44	0.88	0	5.13	8.4	25.8	50.3	16.3	32.5	527
16	11.8	4	0.35	4.01	0.35	1.06	0	4.61	8.2	22.7	49.3	17.7	36.1	535
17	11.5	4.7	0.46	3.45	0.34	0.8	0	4.46	8.4	21.8	49	18.8	38.5	634
18	10.6	3.6	0.21	2.96	0.84	0.42	0	4.37	8.6	24.8	49.9	17.3	34.6	674
19	11.2	2.7	0	0	0	0	0	4.45	8.4	21.7	48.9	18.8	38.7	676
20	10.3	3.9	0.41	2.57	0.51	0.3	0	4.85	8.2	24.3	50.2	16.9	33.7	469
21	11.7	4.8	2.34	0.35	1.98	0.81	0	4.32	9.1	24.3	49.5	18.4	37.4	662
Valores normales de Merck														
Conteo de globulos blancos 10 ³ /uL: 5.6-12.1				Neutrofilos en banda 10 ³ /uL: 0-0.1			Basofilos 10 ³ /uL: 0-0.3			Volumen corpuscular medio fL: 37-49				
Conteo de linfocitos 10 ³ /uL: 1.2-5.1				Neutrofilos segmentados 10 ³ /uL: 2.9-8.5			Hemoglobina g/dL: 10-16			Hemoglobina corpuscular media pg: 13-39.3				
Monocitos 10 ³ /uL: 0-0.7				Eosinofilos 10 ³ /uL: 0-0.8			Hematocrito %: 27-43			Concentración media de hemoglobina corpuscular g/dL: 35.3-39.3				
Conteo de plaquetas 10 ³ /uL: 117-256														

Equino 4: En la evaluación del estado general de salud el equino presentaba signos de debilidad y anorexia entre el tercer y 4 día siendo la de este día más elevada con 38.85°C. Posteriormente, a partir del octavo día, la temperatura empezó a disminuir y se mantiene normal por el resto del experimento.

Microscópicamente, a partir del día 3, los glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito empezaron a disminuir ligeramente. Este equino mostró significativas elevaciones de los glóbulos blancos los días 2, 3 y 18, considerando que presentó una leucocitosis marcada en todo el experimento excepto los días 9, 11 y 13, cuyos valores se encuentran dentro del rango.

“Análisis hematológicos en equinos infectados naturalmente con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Minatitlán, Veracruz”.

Los linfocitos presentan una variación notoria el día 3, 12 y 17 con elevaciones superiores al valor de referencia. Se observó monocitosis en los días 3, 8, 20 y 21.

Biometria hematica Equino 4														
Día	Conteo de glóbulos blancos 10 ³ /uL	Conteo de linfocitos 10 ³ /uL	Monocitos 10 ³ /uL	Neutrofilos en banda 10 ³ /uL	Neutrofilos segmentados 10 ³ /uL	Eosinofilos 10 ³ /uL	Basofilos 10 ³ /uL	Conteo de glóbulos rojos 10 ⁶ /uL	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	Volumen corpuscular medio fL	Hemoglobina corpuscular media pg	Concentración media de hemoglobina	Conteo de plaquetas 10 ³ /uL
1	18	6.8	0	0	0	0	0	5.4	9.6	23.1	42.9	17.7	415	932
2	20.1	6.7	0	3.84	1.8	0.6	0	5.47	9.9	24.1	4.1	18	41	1183
3	21.4	8	1.07	10.7	3.63	0.42	0	5.75	9.9	25.7	44.7	17.2	38.5	968
4	15.8	6.3	0	3.79	1.58	0.63	0.31	5.02	9.5	21.9	43.8	18.9	43.3	*
5	18.5	6.2	0.5	2.96	0.92	0.18	0	4.95	9.7	21.5	43.5	19.5	45.1	*
6	13.8	4.6	0.13	3.7	1.5	0	0	5.13	9.7	22.5	43.9	18.9	43.1	*
7	14.2	5	0.28	4.97	0.71	1.27	0.28	4.98	9.4	21.8	43.8	18.8	43.1	*
8	11.9	4.2	0.83	2.14	0.71	0.35	0.11	4.97	8.5	21.9	44.1	17.1	38.8	892
9	10	3.7	0	2	1.2	0	0	4.84	8.1	21.1	43.7	8.1	16.7	1122
10	10.5	4.6	0.52	1.99	0.94	0	0.1	4.83	8.9	21.1	43.9	18.4	42.1	995
11	11.2	4.5	0.56	3.13	0.56	0.33	0.11	4.74	8.7	20.7	43.8	18.3	42	971
12	12.4	12.6	0.37	3.34	0.12	0.48	0.12	4.74	8.7	20.6	43.6	18.3	42.2	*
13	9.4	2.2	0.09	2.44	0.47	0.75	0	4.78	8.5	2.8	43.6	17.7	40.8	915
14	16.5	6.6	0.16	4.78	0.49	0.08	0	4.68	8.9	22.9	49	19	38.8	906
15	14.7	4.5	0	4.11	0.29	0.29	0.14	4.86	8.9	23.9	49.3	18.3	37.2	894
16	17.7	6.8	0.17	4.77	0.35	0.35	0	4.76	8.4	23.5	49.4	17.6	37.7	936
17	18.2	7.5	0.18	3.62	1.09	0.18	0	4.83	8.6	23.9	49.5	17.8	35.9	840
18	18.7	6.4	0.74	3.92	0.93	0.18	0	4.78	8.4	23.7	49.6	17.5	35.4	805
19	15.9	6.4	0	0	0	0	0	4.39	8.4	21.4	48.8	19.1	33.2	944
20	14.7	6.1	0.8	1.6	0.5	0.14	0	4.35	8.1	21.5	49.5	18.6	37.6	635
21	15.5	7	0.9	2.3	1.5	0	0	4.6	8.1	22.7	49.5	1.6	35.6	742

Valores normales de Merck				
Conteo de glóbulos blancos 10 ³ /uL: 5.6-12.1	Neutrofilos en banda 10 ³ /uL: 0-0.1	Basofilos 10 ³ /uL: 0-0.3	Volumen corpuscular medio fL: 37-49	
Conteo de linfocitos 10 ³ /uL: 1.2-5.1	Neutrofilos segmentados 10 ³ /uL: 2.9-8.5	Hemoglobina g/dL: 10-16	Hemoglobina corpuscular media pg: 13 -39.3	
Monocitos 10 ³ /uL: 0-0.7	Eosinofilos 10 ³ /uL: 0-0.8	Hematocrito %: 27-43	Concentración media de hemoglobina corpuscular g/dL: 35.3-39.3	
Conteo de plaquetas 10 ³ /uL: 117-256	*: El valor no existe			

Equino 5: La evaluación clínica: el equino no presenta signos de enfermedad, la temperatura se mantiene dentro de los rangos normales.

Los glóbulos blancos mostraron elevaciones importantes los días 1, 3 y 16 encontrándose por encima del valor de referencia y del valor (13.8) registrado antes de la exposición. No hay cambios dentro de los linfocitos. Se presenta monocitosis el día 11, 14 y 17. Eosinófilos y basófilos no representan cambios significativos. Los glóbulos rojos se ven disminuidos todo el tiempo, la hemoglobina disminuyó a partir del sexto día hasta el término del experimento.

“Análisis hematológicos en equinos infectados naturalmente con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Minatitlán, Veracruz”.

Biometria hematica Equino 5														
Día	Globulos blancos 10 ³ /uL	Conteo de linfocitos 10 ³ /uL	Monocitos 103/uL	Neutrofilos en banda 103/uL	Neutrofilos segmentados 103/uL	Eosinofilos 103/uL	Basofilos 103/uL	Globulos rojos 10 ⁶ /uL	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	Volumen corpuscular medio fL	Hemoglobina corpuscular media pg	Concentración media hemoglobina corpuscular g/dL	Conteo de plaquetas 10 ³ /uL
1	14.6	4.1	-	-	-	-	-	5.68	10.1	24.2	42.7	17.7	41.7	776
2	11.7	3.1	0.23	6.2	0.81	0.35	0.11	5.84	10.3	26	44.6	17.6	39.6	864
3	14.4	4.7	0.14	7.34	1	0.28	0	6.2	10.3	28	45.2	16.6	36.7	651
4	12.6	2.5	0.12	4.78	2.14	1.63	0.12	5.85	10.1	26.2	44.4	17.2	38.5	754
5	8.4	1.9	0	2.26	0.33	0.16	0.08	6.06	10.1	27.2	45	16.6	37.1	695
6	7.1	1.7	0.37	1.87	0.16	0.75	0.07	5.85	9.5	26.4	45.2	16.2	35.9	527
7	7.7	1.2	0.46	1.46	0.53	0.23	0.07	5.79	9.4	26	45	16.2	36.1	545
8	8.1	1.5	0	3.56	0.81	0.4	0	5.51	8.5	24.6	44.8	15.4	34.5	526
9	1.5	1.4	0.07	3.52	0.37	0.67	0	5.59	8.9	25	44.9	15.4	35.6	602
10	8.7	1.8	0.17	0.17	0	3.56	0.17	5.74	8.7	26.1	45.5	15.1	33.3	442
11	10.5	2.4	0.84	3.46	0.31	1.57	0.1	5.48	8.7	24.7	45.1	15.8	35.2	478
12	12.2	5.3	0.81	5.12	1.09	1.09	0	5.44	8.9	24.3	44.7	16.3	36.6	535
13	11.7	3.2	0	4.79	0	1.17	0	5.63	8.9	26.5	45.6	15.2	33.5	409
14	11.5	3.5	1.03	3.79	0.23	0.69	0	5.32	9.3	26.5	44.9	17.4	35	551
15	12.2	3.4	0.36	5	0.48	0.73	0	5.25	8.4	26.4	50.3	16	31.8	466
16	12.9	3.3	0	6.83	0.25	0.64	0	5.4	8.6	27.3	50.7	15.9	31.5	431
17	13.5	3.9	0.81	2.29	0.4	0.27	0.13	5.24	8.4	26.6	50.8	16	31.5	397
18	13.7	3.2	0.13	6.02	0.41	0	0	4.86	8.2	24.3	50.2	16.8	33.7	411
19	16.3	3.4	0	0	0	0	0	5.6	9.3	28.3	50.6	16.5	32.8	527
20	18.9	3.5	0.16	11.9	2.6	0	0	4.65	7.6	23.2	50	16.3	32.7	403
21	11.6	2.9	0.11	5.5	9.2	10.4	0.23	4.5	7.6	23	50.1	16.5	33	411

Valores normales de Merck			
Conteo de glóbulos blancos 10 ³ /uL: 5.6-12.1	Neutrofilos en banda 103/uL: 0-0.1	Basofilos 103/uL: 0-0.3	Volumen corpuscular medio fL: 37-49
Conteo de linfocitos 10 ³ /uL: 1.2-5.1	Neutrofilos segmentados 103/uL: 2.9-8.5	Hemoglobina g/dL: 10-16	Hemoglobina corpuscular media pg: 13-39.3
Monocitos 10 ³ /uL: 0-0.7	Eosinofilos 103/uL: 0-0.8	Hematocrito %: 27-43	Concentración media de hemoglobina corpuscular g/dL: 35.3-39.3
Conteo de plaquetas 10 ³ /uL: 117-256			

Equino 6: El individuo mantiene un estado de pasividad en todo el proyecto sin embargo en el segundo y tercer día pos exposición el equino se mantiene echado la mayor parte del día y con la cabeza apoyada en el suelo, este comportamiento coincide con la elevación de la temperatura que llega a ser de hasta 39.64°C

Según el comportamiento observado, los glóbulos blancos superan el valor de referencia (14.8) los días del 1 al 9, entrando posteriormente por 4 días de dentro de los rangos normales. Este animal presentó una linfocitosis los días 2, 3 y 15. Se presentó también monocitosis los días 5 y 18. Este equino es el único que presenta una eosinofilia ligera, pero constante a partir del tercer día de exposición. Los glóbulos rojos y hematocrito se ven disminuidos en toda la fase experimental.

“Análisis hematológicos en equinos infectados naturalmente con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Minatitlán, Veracruz”.

Biometría hemática Equino 6

Día	Globulos blancos 10 ⁹ /uL	Linfocitos 10 ⁹ /uL	Monocitos 10 ³ /uL	Neutrofilos banda 10 ³ /uL	Neutrofilos segmentados 10 ³ /uL	Eosinofilos 10 ³ /uL	Basofilos 10 ³ /uL	Conteo de globulos rojos 10 ⁶ /uL	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	Volumen corpuscular medio fL	Hemoglobina corpuscular media pg	Concentración media de hemoglobina	Conteo de plaquetas 10 ⁹ /uL
1	18.5	5.6	0	0	0	0	0	5.82	9.7	25.8	43.7	16.3	37.5	612
2	20.4	6.6	0	10.6	0.4	0.81	0	6.02	9.7	27.2	45.3	16.1	36.6	636
3	23.9	7.6	0.71	11.71	0	1.19	0	5.54	9.5	24.5	44.3	17.1	38.7	677
4	20.4	4.2	0.2	11.01	1.22	2.04	0	5.12	8.9	22.5	44.1	17.3	39.5	646
5	19.4	3.9	1.59	8.35	0.79	1.34	0	5.41	9.5	23.9	44.2	17.5	39.7	728
6	17.8	3.5	0	8.18	0.31	0.07	0.03	5.33	8.9	23.7	44.5	16.6	37.5	624
7	17.8	3.5	0	9.25	0.53	1.97	0.17	5.52	8.8	25	45.4	15.9	35.2	470
8	17.1	3.6	0.51	2.56	1.19	1.02	0.17	5.42	8.1	24.4	45.2	14.9	33.1	534
9	13.5	2.6	0.11	3.78	0.67	0.68	0.11	4.73	7.7	20.7	43.8	16.2	37.1	582
10	9.4	2.8	0	11.8	0.59	1.18	0	4.44	7.1	19.5	44	15.9	36.4	453
11	8.5	1.7	0.28	3.65	0.11	0.39	0.05	4.4	7.1	19.2	43.8	16.1	36.9	446
12	11.3	3.4	0.9	1.92	0.56	2.14	0	4.62	7.7	20.2	43.9	16.6	38.1	571
13	11.7	2.6	0.23	3.97	0.23	1.05	0	4.53	7.5	19.8	43.4	16.5	37.8	465
14	17.2	3.7	0.34	6.19	1.2	2.92	0	4.47	8	22	49.3	17.8	36.3	466
15	19.8	9.3	0.03	6.53	0.39	3.36	0.19	4.76	8.4	23.3	44.1	17.6	36	586
16	16.5	3.8	0	8.74	0	1.98	0	4.22	7.6	20.7	44.1	18	36.7	387
17	17.2	5.1	0.34	7.05	0.17	1.21	0	4.27	7.2	20.4	49.1	16.8	34.4	425
18	17	3.6	1.36	6.8	0.39	1.36	0.34	4.2	7	20.6	44.1	16.6	33.9	417
19	17.2	3.4	0	0	0	0	0	4.37	7.6	21.3	48.8	17.3	35	551

Valores normales de Merck														
Conteo de globulos blancos 10 ³ /uL: 5.6-12.1				Neutrofilos en banda 10 ³ /uL: 0-0.1				Basofilos 10 ³ /uL: 0-0.3			Volumen corpuscular medio fL: 37-49			
Conteo de linfocitos 10 ³ /uL: 1.2-5.1				Neutrofilos segmentados 10 ³ /uL: 2.9-8.5				Hemoglobina g/dL: 10-16			Hemoglobina corpuscular media pg: 13-39.3			
Monocitos 10 ³ /uL: 0-0.7				Eosinofilos 10 ³ /uL: 0-0.8				Hematocrito %: 27-43			Concentración media de hemoglobina corpuscular g/dL: 35.3-39.3			
Conteo de plaquetas 10 ³ /uL: 117-256														

Equino 7: No se observaron cambios de comportamiento, y en la evaluación del estado fisiológico solo se presentó alteración en la temperatura, la cual se elevó a partir de las 12 horas de exposición, manteniéndose elevada por 4 días consecutivos, y posteriormente, tuvo fiebre cíclica por dos días con 9 horas de temperatura normal y 15 horas de temperatura elevada. A partir del séptimo día la temperatura se normalizó.

Los leucocitos se mantienen estables en todo el experimento excepto los días 17 y 18 que presentaron elevaciones mayores a los de referencia. Se presentó monocitosis los días 2 y 21. Los eosinofilos y basófilos no presentaron cambios significativos. Los glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito se vieron disminuidos toda la fase experimental.

“Análisis hematológicos en equinos infectados naturalmente con el virus de la Encefalitis Equina Venezolana en Minatitlán, Veracruz”.

Biometría Hemática Equino 7															
Día	Globulos blancos 10 ⁹ /uL	Conteo de linfocitos 10 ⁹ /uL	Monocitos 10 ³ /uL	Neutrofilos en banda 10 ³ /uL	Neutrofilos segmentados 10 ³ /uL	Eosinofilos 10 ³ /uL	Basofilos 10 ³ /uL	Conteo de globulos rojos 10 ¹² /uL	Hemoglobina g/dL	Hematocrito %	Volumen corpuscular medio fl.	Hemoglobina corpuscular media pg	Concentración media de hemoglobina	Conteo de plaquetas 10 ⁹ /uL	
1	10	2.6	0	0	0	0	0	5.93	9.8	25.5	43.1	16.5	38.4	703	
2	10.8	2.9	0.1	4.42	0.97	0.75	0	3.96	9.7	26.5	44.5	16.2	36.6	720	
3	10.7	3.1	4.38	4.17	1.28	6.42	0	5.68	10.3	24.8	43.8	18.1	41.5	970	
4	9.1	2	0.18	1.54	3.09	1.45	0.18	5.18	9.1	22.9	43.4	17.5	40.6	810	
5	5.5	1	0.38	1.21	0.05	0.6	0.05	5.14	8.7	22.3	43.5	16.9	39	732	
6	3.9	12	0	0.81	0.31	0.07	0.03	5.2	8.7	22.7	43.8	16.7	38.3	651	
7	5.1	13	0.1	1.88	0.15	0.4	0.05	5	8.9	21.7	43.4	17.8	41	639	
8	5.1	1.1	0.51	2.56	1.19	1.02	0.17	4.68	7	20.2	43.3	16.4	38.1	568	
9	5.7	28.9	0.11	0.62	0.28	0.68	0.11	4.6	7.9	19.8	43.2	17.1	39.8	713	
10	6.2	16	0.31	0.49	0.06	0.68	0	5.1	7.9	22.5	44.3	15.4	35.1	479	
11	5.6	2	0.28	1.23	0.11	0.39	0.05	4.85	8.5	21	43.5	17.5	40.4	669	
12	7	3.5	0.07	2.24	0.28	0.56	0	4.4	7.5	18.9	43.1	17	39.6	592	
13	6.3	3.2	0.06	1.95	0.37	0.75	0	4.78	7.9	20.8	43.7	16.5	37.9	582	
14	8.8	2.3	0	2.9	0.35	1.05	0	4.71	8.9	22.9	48.7	18.8	38.8	613	
15	8.8	2.2	0.17	4.22	0.26	0.79	0.08	4.52	8.2	21.7	48.2	18.1	37.7	709	
16	10.1	2.7	0.1	5.65	0.2	0.3	0	4.85	8.1	23.9	49.4	16.7	33.8	501	
17	13.2	2.4	0.13	5.8	1.58	0.26	0	4.47	7.6	21.7	48.7	17	35	532	
18	12.9	2.4	0.12	6.57	2.06	0.77	0	4.54	7.9	22.1	48.8	17.4	35.7	596	
19	9.2	3	0	0	0	0	0	4.4	8.1	21.4	48.4	18.2	37.8	627	
20	8.2	2.2	0.16	7.9	0.98	0.57	0	4.29	7.4	20.8	48.5	17.2	35.5	547	
21	9.3	2.4	1.02	2.32	1.39	0.95	0.09	4.47	7.2	22	49.3	16.1	32.7	456	
Valores normales de Merck				Conteo de plaquetas 10 ³ /uL: 117-256				Eosinofilos 10 ³ /uL: 0-0.3				Volumen corpuscular medio fl.: 37-49			
Conteo de globulos blancos 10 ³ /uL: 5.6-12.1				Neutrofilos en banda 10 ³ /uL: 0-0.1				Hemoglobina g/dL: 10-16				Hemoglobina corpuscular media pg: 13.-39.3			
Conteo de linfocitos 10 ³ /uL: 1.2-5.1				Neutrofilos segmentados 10 ³ /uL: 2.9-8.5				Hematocrito %: 27-43				Concentración media de hemoglobina corpuscular g/dL: 35.3-39.3			
Monocitos 10 ³ /uL: 0-0.7				Eosinofilos 10 ³ /uL: 0-0.8											

II. Discusión

Las investigaciones de campo siempre han sido subestimadas por la presencia de multivariantes que impiden el desarrollo óptimo de un experimento. Estudios anteriores solo habían trabajado con el virus de la EEV bajo estrictas condiciones de control y seguridad, como Quinn *et al.* (2008), quienes describieron los cambios encontrados en equinos infectados con EEV, con énfasis en la etapa de viremia, donde observaron el desarrollo del proceso de inmunidad y la actividad de las células de protección en los individuos infectados experimentalmente. En esas condiciones, es decir, conociendo el momento del desafío, es relativamente sencillo estimar el momento en que se presentan la viremia y los signos clínicos de la enfermedad. Sin embargo, los problemas de salud pública se desarrollan en condiciones de campo que pueden impedir al médico llegar a un diagnóstico presuntivo por la limitación de técnicas especializadas o específicas necesarias para hacer un diagnóstico, por lo menos preliminar de la enfermedad.

Considerando que los virus siempre han representado problemas de salud pública por la limitación de recursos diagnósticos como menciona Chin en 2007 o Álvarez y col., 1999, nosotros utilizamos el tejido de más fácil acceso para este estudio. La sangre, que además de ser un tejido esencial en el organismo sirve de vehículo y resguardo de muchas enfermedades, por ejemplo; en la sangre el *Alphavirus* lleva a cabo su ciclo de vida. Por lo tanto aterrizando la idea de Hernández en 2013, quien propuso que estudiar los cambios producidos en este líquido vital permite realizar un diagnóstico presuntivo, puesto que nos permite generar conocimientos sobre la fisiopatología de la EEV y su desarrollo dentro del paciente equino, lo que permite enfocar acciones preventivas para asegurar la salud de la población.

Son pocas las disciplinas en las que el médico puede precisar un diagnóstico prescindiendo de herramientas de laboratorio específicas, sobre todo si nos

enfrentamos a enfermedades infecciosas, dada la posible similitud en signos clínicos que muchas de ellas pueden compartir. Sin embargo, herramientas básicas como la biometría hemática, pueden ser utilizadas con esta finalidad, debido a que permite conocer los cambios de algunos parámetros sanguíneos, los cuales suelen ser indicativos de una infección, lo que permite orientar el diagnóstico presuntivo a un cierto tipo de patógeno bacteriano, parasitario o viral como el de la EEV.

Basados en el estudio realizado por Dickerman en 1964, sobre la caracterización de las áreas endémicas de EEV, y en el estudio de Aguilar *et al.* (2011) sobre el comportamiento ecológico del vector, se ubicó el sitio donde se realizó el presente estudio. Las características ecológicas del lugar permitieron considerar una alta probabilidad de encontrar al vector de EEV y al propio virus, lo que nos hizo sospechar que animales susceptibles como los equinos, podrían infectarse y desarrollar la enfermedad. Una de las bondades del presente estudio, es que contribuye a generar un mapa epidemiológico de la EEV en México, de zonas que, al cumplir con las características ecológicas, permiten el desarrollo y supervivencia del virus. La investigación se desarrolló en Minatitlán Veracruz, en el ejido Tacoteno (N18^a, 00',27.02'', W94^a,31',00.99''), que es una área rodeada de regiones pantanosas y cercana a conjuntos habitacionales y zonas dedicadas a la agricultura y ganadería, y al mismo tiempo sumergida en áreas silvestres. Estos factores aumentan el riesgo de distribución y transmisión del virus a las poblaciones susceptibles animal y humana. Lo cual concuerda con García *et al.* (2002), quien se refirió a la EEV como una enfermedad compleja en lo que respecta a elementos de tipo ecológicos, condiciones climáticas, características estacionales y diversidad de reservorios, mismos que intervienen directamente en la ocurrencia de la enfermedad tanto en animales como en humanos.

En el presente estudio se utilizó la biometría hemática como indicador de infección presuntiva por EEV en equinos. La evaluación se realizó a través de la observación de los cambios de comportamiento, los signos clínicos y las variaciones en los parámetros sanguíneos. Las observaciones empezaron desde el día 1, momento en que el equino fue introducido al sitio donde se conoce de la existencia del vector y se sospecha de la circulación de EEV, y concluyeron el día 21. Los resultados obtenidos arrojaron que, dentro del periodo de estudio, el 86% de los animales experimentales enfermaron, presentando, en su mayoría, cambios ligeros de comportamiento que consistían en apatía, debilidad muscular y cabeza gacha, sin observarse signos nerviosos. La temperatura presentó un comportamiento bifásico en 5 de los 7 equinos, en quienes presentaron una temperatura de hasta 40.05°C, es decir 1.55°C arriba del valor normal que es de 38.5°C, a partir de las primeras doce horas de exposición, y que fue más notoria los días 3, 4, 7, 19 y 21. Estos cambios de temperatura nos ayudaron a identificar con mayor facilidad los periodos de viremia puesto que según Mesa en 2005, la fiebre es indicativa de títulos elevados de virus en sangre. Es por eso que, en esta etapa se debe estar alerta a los cambios de comportamiento y sanguíneos que presente el equino, ya que es en este momento que actúan no solo como animales enfermos, sino también se les atribuye el papel de amplificadores virales, lo que incrementa el riesgo de infección y propagación viral.

En las biometrías hemáticas observamos que 5 de los 7 equinos presentaron una leucocitosis ligera acompañada de una linfocitosis con desviación a la izquierda, indicativos de un proceso infeccioso. El sexto equino presentó leucopenia en esta fase. Es decir los equinos en estos días estaban pasando por un proceso infeccioso que despertó su sistema inmune y se reveló mostrando las variaciones en la serie blanca.

La serie roja sin embargo se vio afectada a partir del día 4, también en seis de los siete equinos, con disminuciones ligeras, pero constantes, en el conteo de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito. Solo uno de los animales se mantuvo dentro de los parámetros normales. Las células como eosinófilos, basófilos no mostraron cambios patológicos aparentes, pero es importante hacer énfasis en que todos los equinos presentaron una trombocitosis marcada en toda la fase experimental. Esta podría ser atribuible al estrés al cual fueron sometidos los equinos durante la toma de muestra, ya que estos animales habían tenido muy poco manejo y se fueron adiestrando a la par con el experimento, y no se les había entrenado para este procedimiento, por lo que se mostraron nerviosos y defensivos durante el proceso

La trombocitosis también se presentó antes y durante del experimento cuando a los equinos se les tomó la muestra para practicar la prueba de HI y PNRT pre exposición y pos exposición, los resultados fueron respectivamente, negativos y positivos. La confirmación de la sospecha de infección realizada por el diagnóstico presuntivo se llevó a cabo en un experimento paralelo en el que se procesaron muestras de suero para realizar el aislamiento viral y se confirmó en 6 de los 7 animales la viremia por EEV. Además como aporte adicional a la investigación y en simultaneidad al experimento se tomaron muestras de suero sanguíneo que al igual que el trabajo realizado por Estrada de 2004 reveló la infección en equinos por el virus de la EEV al lograr el aislamiento del virus en el suero sanguíneo de estos animales. Esto confirmó los resultados obtenidos en las biometrías hemáticas, indicando que no solo los equinos en efecto se enfermaron bajo condiciones naturales, sino también nos permitió conocer el día en que cada individuo presentó la viremia, que fue entre los días 11 y 16 postexposición respectivamente. Hay que recordar que los equinos presentaban signos clínicos sugerentes de infección entre los 3 y 7 días postexposición, es decir, dos días antes de que se lograra el aislamiento. Por lo tanto podemos decir que los signos

clínicos y los cambios significativos en las biometrías hemáticas se dan un par de días antes de la viremia más alta, momento en el que el equino se convierte en un amplificador viral y es posible el aislamiento.

Entendiendo que la sangre es un tejido que puede descomponerse con facilidad y que esto también podría haber influido en los resultados de nuestro experimento, se realizaron biometrías hemáticas automatizadas para controlar el mayor número de variables en el manejo de las muestras y así prevenir lo que ocurrió con los estudios realizados (1964 y 1968) sobre EEV, cuyos resultados no fueron exitosos, debido a la falta de control de algunas variables inducidas por el error humano y las condiciones de conservación de las muestras. El uso de un equipo automatizado elimina el error humano, aumentando la eficiencia en el procesamiento de las muestras, y de manera indirecta mejora la calidad de las muestras de sangre procesadas ya que los efectos del tiempo y el medio ambiente caluroso en el estado de Veracruz (durante el verano de 2014 fecha en que se realizó el proyecto experimental, se vivió la tormenta tropical “Dolly”, que mantenía olas de calor de entre los 35 y 45 grados centígrado), sobre la descomposición de la sangre, que podrían haber tenido efectos negativos sobre los resultados de las biometrías hemáticas.

Sin embargo a pesar de disminuir la variabilidad de resultados y probabilidad de error que generaba la técnica manual con termómetro rectal con nuestra segunda herramienta de apoyo es decir los chips subcutáneos para medir la temperatura (técnica usada por Estrada en 2004), no coincidió las elevaciones de temperatura con la fecha de aislamiento, debido a que estos chips tiene un mayor grado de afectación por las condiciones climáticas en que vive el animal, al haber sido colocados en la área subcutánea, según el posicionamiento del caballo estos pueden obtener calor del animal, y los rayos solares aumentando o disminuyendo la temperatura registrada.

Por lo tanto debemos mencionar que tanto la temperatura como los cambios presentes en las biometrías hemáticas, son representativos de una etapa temprana de viremia o bien la “viremia primaria” en la que el virus se replica en forma constante, pero en pequeñas cantidades a lo cual el sistema inmune reacciona con elevaciones de temperatura y cambios en sangre hasta que el virus ha logrado alcanzar sus máximos niveles de reproducción, generando al mismo tiempo una estabilidad en el individuo que garantiza la supervivencia del agente viral.

Lo anteriormente mencionado, se encuentra ligado a lo que observamos en nuestra población experimental, donde de los 7 equinos 86% presentó ligeros cambios de comportamiento que entre los que se podían observar debilidad muscular, cabeza apoyada al suelo, y ligero tambaleo así como variaciones en su temperatura un par de días antes de lograr el aislamiento viral. Por lo tanto el virus circulante en esta región, induce viremas bajas con signos clínicos poco evidentes son fiebre, decaimiento y ligera postración en esta etapa no es posible realizar el aislamiento viral a diferencia de Garman en 2010 y Estrada en 2012, en cuyos modelos equinos el aislamiento se logró e que hubo cambios en las muestras hemáticas y signos clínicos siendo el principal el de temperatura corporal elevada. Lo que significa que el virus podría haber infectado a los equinos desde el primer día de exposición, pero no se detectó en ese momento, dado que se requiere un periodo de incubación de tres días, con una viremia relativamente baja que no pudo ser detectada por las técnicas de HI y PNRT pero que sí se vio reflejado en los primeros cambios en las biometrías de esos días. En la segunda etapa crítica, que se presentó del séptimo al onceavo día, donde la anemia era más marcada y la serie blanca presentaba elevaciones (principalmente leucocitosis y neutrofilia) se hizo evidente que se estaba presentado un proceso inflamatorio que podría interpretarse como una viremia elevada, de la cual fue posible aislar el virus tal como sucedió con Garman en 2010 y Estrada en 2012.

Considerando que el virus y el vector están presentes en la región en estudio y que 6 de 7 animales se infectaron, resulta sorprendente que animal con el número 3 no haya presentado ningún tipo de cambio clínico y no se haya logrado aislar el virus de él. Esto podría tener 2 posibles explicaciones, primero que simplemente el animal no haya sido víctima del vector, y por lo tanto no se hubiera infectado. Esta hipótesis resulta un poco difícil de defender, dado que el animal estuvo bajo las mismas condiciones que el resto de los animales experimentales. Una segunda hipótesis podría ser que, a pesar de estar infectado, la viremia no hubiera sido lo suficientemente elevada para despertar el sistema inmune del caballo, ni para inducir cambios, ni a nivel clínico general, ni a nivel de biometría hemática. Es decir, que el animal tuviera una resistencia natural al virus. Si esto fuera cierto, futuros estudios deberían estar encaminados a conocer las causas por las que ese animal no enfermó de EEV.

A pesar de los hallazgos encontrados en este estudio de los cuales uno de los más importantes fue el aislamiento del virus, podemos determinar que este agente no es altamente patógeno para esta población en específico, refiriéndonos a este como un subtipo enzoótico o selvático que se caracteriza por encontrarse en áreas geográficas limitadas y su desarrollo y propagación depende de pequeños vectores como los roedores y mosquitos, y por lo tanto sería posible encontrar anticuerpos de EEV en humanos y animales que han desarrollado una respuesta inmunitaria efectiva al virus. Sin embargo, por tratarse de una zoonosis, se debe disponer de metodologías que permitan un diagnóstico presuntivo rápido y sencillo posible de la EEV. Para lograr el control efectivo de la enfermedad cuyos brotes pueden tornarse agresivos ya que aunque la EEV que se encontró en la población equino no es letal como se pensaba en un principio, sospechamos que nos encontramos con un subtipo enzoótico o selvático el cual puede generar brotes en condiciones que mantengan a la población inmunodeprimida como los cambios bruscos condiciones climáticas y de salud que aumenten no solo la susceptibilidad

de la población a infectarse (Mesa *et al*, 2005) como el brote causada por el Subtipo IE en México en 1993, si no que permitan la adaptación del virus y con ello lograr la mutación del mismo en una versión más agresiva para la población.

Actualmente México se considera un país libre de EEV, sin embargo, en años pasados se reportaron brotes y epidemias que afectaron a la población de manera inesperada (Mesa, 2005). Por eso, debemos contar con una herramienta que nos permita realizar un diagnóstico presuntivo que contribuya a la vigilancia epidemiológica de la EEV. Este es el caso de la biometría hemática que, utilizándola a manera de monitoreo continuo entre las poblaciones en riesgo, podría contribuir a realizar un diagnóstico presuntivo de la situación, misma que generaría datos de referencia para la conformación de una guía que le permita al médico fundamentar su diagnóstico preliminar, que coadyuve a la detección y control de la enfermedad, pero que deberá ser validada por métodos específicos que confirmen el diagnóstico, como son el aislamiento del agente patógeno.

III. Conclusiones

La biimetría hemática es un estudio de apoyo para el diagnóstico temprano de enfermedades virales tales como la EEV y que deberán ser confirmadas por el aislamiento viral en la etapa de viremia.

Los datos encontrados a través de la Biimetría hemática permiten confirmar reportes anteriores que indican que la primera viremia post infección con el virus de la EEV, se presenta al tercer día de exposición y la segunda viremia se presenta entre el sexto y séptimo día post exposición.

Durante las etapas de viremia se puede observar que, el virus de EEV que circula actualmente en la región en estudio, induce una disminución en los valores de las células rojas, aumento en los valores de la serie blanca, y la presentación de signos clínicos sutiles.

Seis de los siete equinos expuestos al virus se infectaron en forma natural. Debido a que el equino 3 no se aisló el virus es posible que tenga una característica genética fenotípica que le permite tener resistencia natural al virus.

La vigilancia de los casos equinos nos permite obtener información que nos permita conocer el riesgo de salud pública especialmente en áreas donde no hay registro de la actividad del virus. Sin embargo, se requiere de una investigación profunda que confirme el diagnóstico a través del aislamiento viral.

IV. Sugerencias

Algunos animales como los equinos son los principales biomodelos utilizados en la investigación por lo tanto su organismo podría estar sufriendo adaptaciones que mejoren su resistencia a enfermedades infecciosas, por lo tanto sería recomendable realizar estudios más profundos sobre las características que han permitido a estos individuos desarrollar esa resistencia.

México cuenta con una gran diversidad climática esto hace que los individuos desarrollen características de adaptación al medio ambiente que ayuda a su supervivencia, uno de los problemas al que nos enfrentamos en este proyecto fue a encontrar referencias hemáticas en equinos sanos de Toluca para utilizarla como base de comparación, alno encontrarse se optó por utilizar las referencias de Merck cuyas condiciones e individuos se asemejaban a las de nosotros, sin embargo lo ideal sería generar un cuadro de referencia sobre parámetros sanguíneos en equinos de Toluca que nos permitan hacer una comparación más específica y real, para este y otros experimentos.

En México existen más zonas cuyas condiciones climáticas pueden permitir el desarrollo de esta enfermedad por lo tanto se sugiere aumentar las investigaciones utilizando animales centinelas para formar un mapa de identificación epidemiológica y para generar medidas de prevención.

En caso de desastres naturales es importante transmitir la información de las enfermedades que no solo afectan a humano directamente sino también a los animales para disminuir las enfermedades de origen zoonótico.

V. Literatura citada

1. Acha, P y Szyfres, B. (1986): Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 2° ed., OPS/OMS, Washington, D.C. USA.
2. Adams P, Borland E, Estrada J, Flores J, Leal G, Lopez I, Navarro L, Powers A, Ramirez A, Saxton K, Sing A, Tesh R, Trabssos A, Weaver S (2012): Venezuelan Equine virus activity in the Gulf coast Region of Mexico, 2003-2010. PLoS Negl Trop Dis. 6(11): 1- 15
3. Almager G. (2013): Interpretación clínica de la biometría hemática. Medicina Universitaria, 5(18):35-40.
4. Álvarez E, Ruiz A, Zuñiga I, (1999): Sistema de información y vigilancia epidemiológica de la encefalitis equina venezolana en la región de las Américas. Rev Panam Salud Pública 6(2); 128-138.
5. Aguilar P, Estrada JG, Weaver SC, Haddow A. (2011) Endemic Venezuelan equine encephalitis in the Americas: Hidden under the dengue umbrella. *Future Virology* 6(6):721-740.
6. Anishchenko M, Bowen R, Paessler S, Austgen L, Greene I, Weaver S. (2005). Venezuelan encephalitis emergence mediated by a phylogenetically predicted viral mutation. Proc Natl Acad Sci. 103(13): 4994-4999.
7. Batalla D. (2001). Vacunas de Encefalitis Equina Venezolana. Productora Nacional de Biologicos Veterinarios. S.A.G. México, DF.
8. Brito, E.; Reyes, L.; Olano, V. (2003). Encefalitis equina Venezolana: zoonosis de Importancia en Salud Pública. Revista del ICA.
9. Chin J. (2001): El control de las enfermedades transmisibles. 17ª ed., OPS.

10. Davila S, García G, Heredia G, Torres N, Rivera C. (2012): **Utilidad de la biometría hemática en la práctica clínica. Leucocitos.** Rev Sanid Milit Mex, 1(66):38-46.
11. Deardorff ER, JG Estrada-Franco, JE Freier, Navarro-Lopez, A Travassos Da Rosa, RB Tesh, SC Weaver. (2011). Candidate Vectors and Rodent Hosts of Venezuelan Equine Encephalitis Virus, Chiapas, 2006–2007. *Ame. J. Trop Med* 85 1146-1153.
12. Diana S, Jairo C, Vera J. (2009): Aspectos generales del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV). *Orinoquia*, 13(1):69-67.
13. Dickerman R, Geiger R, Moorhouse A, Ventura A, Scherer W, Wong C. (1964): Venezuelan equine encephalitis virus in Veracruz, México, and the Use of Hamsters as Sentinels. Department of Microbiology Cornell University Medical College. New York, New York.
14. Estrada J. (2004). “Venezuelan equine encephalitis, southern Mexico”. *Emerg Infec Dis* 10(12): 2113-2121.
15. Ferro, C.; Olano, V. (2003). Vectores y reservorios de la Encefalitis Equinas en Colombia. Laboratorio de Entomología. INS. Colombia.
16. *García A, Medina A, Pérez M. (2002). Vigilancia epidemiológica de la encefalitis equina venezolana. Revist científica, FCV-LUZ. 12(4):296-303.*
17. Góngora B, (2003): Enfermedades virales en Hematología. *Gaceta Médica de México*, 139(2):102-105.
18. Hernández R. (2013): Advances and clinical application of automated hematic cytometry. *Revista cubana de hematología, inmunología e inmunoterapia*, 29(1):13-17.

19. IICA. (2008). Encefalitis equina: del este, del oeste y venezolana. [Http://www.ctsph.iastate.edu/IICAB/](http://www.ctsph.iastate.edu/IICAB/). (10 enero 2015).
20. INEGI. Información por identidad: Veracruz. Disponible en[. <http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/ver/territorio/clima.aspx?tema=me&e=30> cita[30 de agosto de 2014].
21. Knipe D and Howley P. (2001)): **Fields Virology**. 4^a ed. Wolters Klower, España.
22. MacLachlon N and Duboui E. (2011): Fenner`s Veterinary virology. 4^a ed., ELSEVIER, Londres.
23. Mesa F, Cárdenas J, Villamil L. (2005): Las encefalitis equinas en la Salud Pública. Editorial Universidad Nacional de Colombia, Bogotá Colombia.
24. Merck S. (2014): Hematologic reference ranges in horses. White station, N.J, U.S.A.
25. Morilla A. (2010): Encefalitis Equina Venezolana. Editorial Instituto de Investigaciones Pecuarias, Servicio Agrícola y Ganadero, México.
26. Morilla A., Mucha J. (1969). Estudio de una epizootia de encefalitis equina de Venezuela ocurrida en Tamaulipas, Mex. Rev. Invest. Salud Pública. 25(1): 14-20.
27. Nieto R. (2004). Principios Universales de Hematología. Editorial Chronodab. México, D.F.
28. Perez N, Plaza N, Medina G, Matheus I, Siger J. (2004): Encefalitis equina: epidemiología, diagnóstico y su interpretación. Revista digital del Centro Nacional de Investigaciones agropecuarias de Venezuela (CENIAP-INIA), número especial. Disponible

en[http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/ne/arti/perez_n/arti/perez_n.htm]*cita*[19 de enero 2015]

29. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. (2008): Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Acribia, S.A., Zaragoza, España.

30. Rivas, F.; De la Hoz, O.; Boshell, J.; Olano, V; Roselli, D. (2003): Epidemic Venezuelan equine encephalitis virus Magdalena Valley, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 9(1):3-8.

31. SENASA (2012): Protocolo de vigilancia de encefalitis equinas. Dirección general de vigilancia EPIDEMIOLOGICA, COSTA RICA.

32. Short T. (2009). “Virus estudio molecular con orientación clínica”. Medica Panamericana. USA

33. Smith J, Davis K, Hart M, Ludwig G, McClain D, Parker M, Pratt W, (2011). Viral Encephalitides. Department of viral viology división, U.S.A.

34. Walton T.; Alvarez O.; Buckwalter R.; Johnson K. (1972): Experimental infection of horses with an attenuated Venezuelan Equine Encephalomyelitis Vaccine (Strain TC-83). “Infeccion and inmunity”. 5(5): 750-756.

Anexo 1. Resultados promedio de biometrías hemáticas

Tabla 1. Resultados promedio de la biometria hematica automatizada.														
	GR	HG	HCM	CMH	Hto	VCM	GB	L	NB	NS	Eo	BA	Mo	P
	6-10.4	10 - 16	13.7-39.3	35.3-39.3	27-43	37-49	5.6-12.1	1.2-5.1	0-0.1	2.9-8.5	0-0.8	0-0.3	0-0.7	117-256
1	6	10.02	17.41	40.75	24.74	42.95	13.8	4.65	5.68	1.92	0.73	0.05	0.24	885.28
2	6.1	10.3	17.25	38.74	26.61	38.95	14.58	4.78	6.59	1.26	0.18	0.01	0.39	940
3	6	10.35	17.42	39.22	26.44	44.6	14.98	5.41	4.47	1.45	1.2	0.08	0.28	716
4	5.35	9.67	18.04	41.14	23.54	44.07	12.81	3.65	2.93	0.54	0.5	0.05	0.44	537.28
5	5.28	9.67	18.31	42.01	23.12	43.84	11.85	3.45	2.93	0.54	0.5	0.05	0.44	495.66
6	5.34	9.41	17.61	40.02	23.55	44.17	9.81	2.74	3	0.74	0.54	0.03	0.13	486.71
7	5.3	9.34	17.61	40.04	23.4	44.18	9.84	2.68	3.46	0.59	0.87	0.11	0.15	613.42
8	5.36	8.51	16.02	36.24	23.8	44.42	9.74	2.7	2.36	0.76	0.46	0.05	0.23	693.85
9	5.15	8.64	16.71	38.14	22.54	44.02	9.22	2.61	2.32	0.62	0.46	0.01	0.1	641
10	5.05	8.41	16.64	37.82	22.3	44.22	8.22	2.64	1.34	0.36	0.32	0.11	0.46	656
11	4.93	8.35	17.41	39.84	21.65	43.94	7.94	2.42	2.57	0.21	0.58	0.04	0.33	560.51
12	4.7	8.52	17.75	40.98	20.82	43.57	10.77	4.57	3.39	0.4	0.84	0.01	0.41	353.71
13	5.02	8.5	16.87	38.47	22.14	44.12	8.71	2.52	2.95	0.3	0.76	0.02	0.14	525
14	4.8	9.07	18.88	38.72	23.51	48.98	12.65	4.07	4.15	0.45	1.12	0	0.31	578.42
15	4.96	8.88	17.92	36.51	24.41	49.27	13.12	3.75	4.6	0.44	1.19	0.05	0.15	585.28
16	4.69	8.47	18.07	36.92	23.12	49.15	13.44	3.98	5.53	0.27	1.03	0	0.23	538.57
17	4.78	8.58	17.87	36.45	23.52	44.2	14.3	4.6	4.68	0.99	0.5	0.01	0.32	550.14
18	4.8	8.47	17.54	35.61	23.71	49.41	13.55	3.64	4.5	0.96	0.75	0.06	0.52	666.42
19	4.64	8.77	18.64	38.31	22.45	48.88	13.94	3.91	4.5	0.96	0.75	0.06	0.52	617.28
20	4.63	8.16	17.56	35.68	22.84	49.34	13.06	3.94	5.4	1.28	0.35	0.06	0.36	608
21	4.62	8.12	14.2	35.38	22.4	44.36	12.2	4.24	2.06	3.29	1.77	0	0.53	599.8

GR: Globulos rojos	GB: Globulos blancos	L: Linfocitos
HG: Hemoglobina	NB: Neutrofilos en banda	P: Plaquetas
HCM: Hemoglobina copuscular media	NS: Neutrofilos segmentados	VCM: Volumen corpuscula medio
CMH: Concentracion media de hemoglobina	Eo: Eosinofilos	Mo: Monocitos
Hto: Hematocrito	BA: Basofilos	